



ПНЕВМОНИИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С SARS-COV-2.

Описанное в статье исследование - одно из первых исследований, посвященных выявлению коинфекции при COVID-19 в Республике Казахстан во время пандемии. Выделенные микроорганизмы этиологически значимы и являются микроорганизмами группы ESKAPE, в большинстве случаев получены в монокультуре, либо вместе с дрожжевыми грибами. Выделенные патогены показали высокую устойчивость к большинству протестированных антибактериальных агентов.

Ключевые слова: COVID-19, антибиотикорезистентность, ESKAPE.

Введение.

Вирусные пневмонии, ассоциированные с новым вирусом SARS-COV-2 стали вызовом для человечества. В Республике Казахстан во время эпидемии было пересмотрено более 10 редакций протоколов диагностики и лечения коронавирусной инфекции [1]. Хотя антибиотики неэффективны для лечения COVID-19, их назначают пациентам с подозрением или подтвержденным COVID-19 по разным причинам [2]. Клинические данные о наличии коинфекции с SARS-CoV-2 имеют большое значение для адекватного лечения антибактериальными препаратами пациентов с пневмонией. Предыдущие исследования показывают, что уровень смертности может увеличиваться при одновременном наличии острой респираторной вирусной инфекции и бактериальной инфекции [3].

Цель: определить вторичную бактериальную флору у пациентов с ковидоподобной пневмонией в Республике Казахстан.

Материалы и методы.

Проспективное, микробиологическое, многоцентровое исследование, которое было проведено на базе медицинского университета г. Караганда в лаборатории коллективного пользования с участием взрослых пациентов (≥ 18 лет). Материал (мокрота) был собран в трех городах Казахстана, отличавшихся наихудшей эпидемиологической ситуацией по SARS-CoV-2: Алматы, Караганда, Атырау. Материал был получен от пациентов в течение 48 часов после поступления в стационар, для исключения пациентов с внутрибольничной пневмонией, приобретенной в стационаре.

Сбор, доставка осуществлялась в соответствие с санитарными нормами совместно с Национальным центром общественного здравоохранения, центром санитарно-эпидемиологической экспертизы и мониторинга.

Микробиологическое исследование полученного материала проводилось классическими методами.

Все исследованные изоляты были идентифицированы до вида методом матрично-ассоциированной лазерной десорбции/ионизации – времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) с использованием системы Microflex LT и

программного обеспечения MALDI Biotyper Compass 4.1.80 (Bruker Daltonics, Германия). Рекомендуемые значения Score $\geq 2,2$ были использованы в качестве критерия надежной видовой идентификации. До проведения анализа изоляты хранили при температуре -70°C в триптиказо-соевом бульоне с добавлением 30% глицерина.

Определение чувствительности к антимикробным препаратам выполнялось диско-диффузионным методом на агаре Мюллера – Хинтона или Мюллера – Хинтона с добавлением 5% бараньей крови в зависимости от возбудителя в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI M100-24). Результаты исследований вносились в базу данных Whonet 6.3 и интерпретировались в соответствии с критериями CLSI (2018) [4]. Для контроля качества определения чувствительности использовали штаммы E. coli ATCC@25922, E. coli ATCC@35218, S. aureus ATCC@29213, E. faecalis ATCC@29212 и Pseudomonas aeruginosa ATCC@27853

Статистическая обработка измерений проводилась с помощью пакета программ SPSS 26 (SPSS Inc, Chicago, IL) и MedCalc 19 и включала описательные методы статистики и χ^2 Фишера.

Участники исследования

В исследовании приняли участие пациенты с COVID-19-положительной и отрицательной пневмонией из Алматы, Караганды и Атырау, сопоставимые по полу, возрасту и объему поражения легких. Критериями включения пациентов в исследование были: двусторонняя внебольничная пневмония с лабораторно подтвержденным SARS-CoV-2 для первой группы и двусторонняя внебольничная пневмония с клиническими доказательствами SARS-CoV-2 и отрицательный результат ПЦР-теста для второй группы. От каждого участника исследования были собраны клинические данные: пол, возраст, дата постановки диагноза двусторонней пневмонии, госпитализация и ПЦР-тест на SARS-CoV-2, процент поражения легких по данным компьютерной томографии, лекарственная терапия антибиотиками, оценка степени тяжести течения болезни (средней, тяжелой).

Таблица 1. Демографическая и клиническая характеристика обследованных больных в городах Алматы, Атырау и Караганды.

	Всего n (%)	г. Алматы n (%)	г. Атырау n (%)	г. Караганды n (%)
Всего	133	39	42	52
Пол, $p > 0.1$				
Мужчины	74 (55,6%)	18 (46,2%)	26 (61,9%)	30 (57,7%)
Женщины	59 (44,4%)	21 (53,8%)	16 (38,1%)	22 (42,3%)



Возраст, mean [SD], p=0.03	60,9 [12,7]	64,4 [11,8]	57,0 [11,9]	61,5 [13,4]
Объем поражения легких в процентах, mean [SD], p=0,02	49,1 [22,2]	50,9 [19,9]	41,7 [24,4]	54,0 [20,3]
Результаты ПЦР мокроты, p=0,003				
ПЦР (+)	53 (39,8%)	7 (17,9%)	19 (45,2%)	27 (51,9%)
ПЦР (-)	80 (60,2%)	32 (82,1%)	23 (54,8%)	25 (58,1%)

Результаты исследования

При микробиологическом исследовании клинического материала в 31,45% был получен рост нормальной микрофлоры. В 55% из мокроты пациентов была получена монокультура в значимом титре (рисунок 1).

Лидирующее место в общей этиологической структуре принадлежало *K.pneumoniae* – 22,64%, на долю *E. coli* пришлось 11,95% выделенных штаммов, в 11,32% случаев был выделен *A. baumannii*. В единичных случаях были выделены не менее важные микроорганизмы - *S.aureus*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *S. pneumoniae*. Обращает на себя внимание, что выделенные микроорганизмы относятся в группе

ESKAPE патогенов. Именно эти микроорганизмы, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.*, представляют глобальную угрозу для человечества [5]. Лидерство внутри группы ESKAPE определяется многими факторами – социальным портретом населения, профилем стационара, спецификой национальных стандартов лечения, эффективностью работы эпидемиологических служб и практикой использования антибиотиков в национальном масштабе.

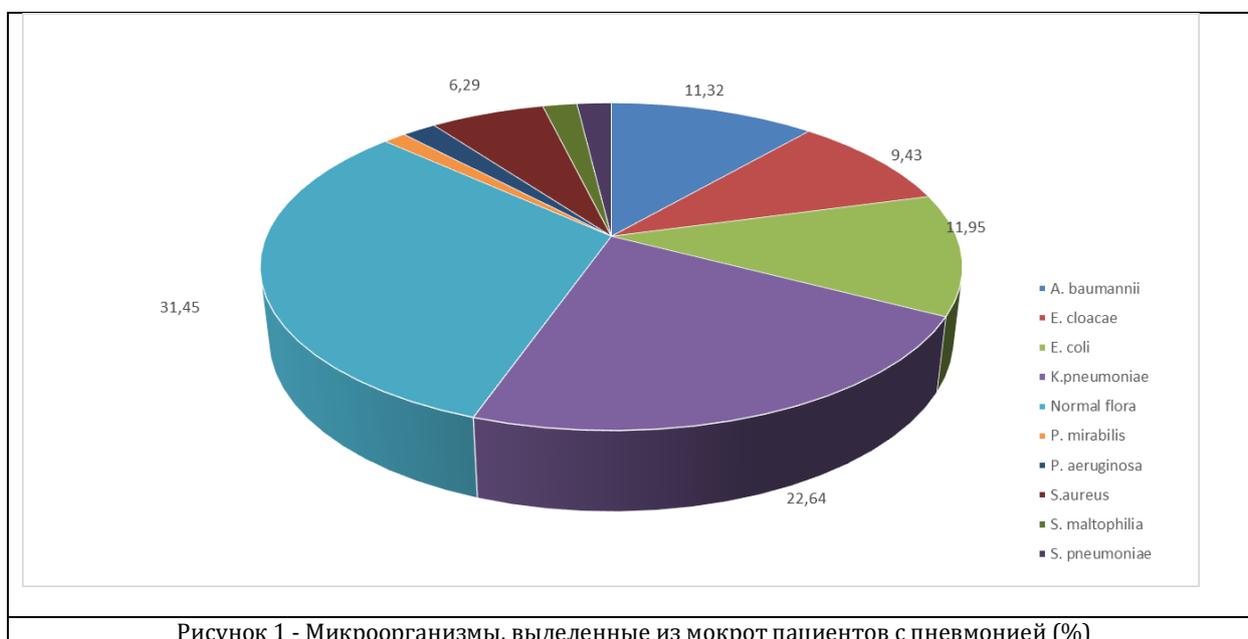


Рисунок 1 - Микроорганизмы, выделенные из мокрот пациентов с пневмонией (%)

Результаты нашего исследования демонстрируют распространение той или иной микрофлоры в зависимости от тяжести пневмонии.

При более тяжелом течении пневмонии от пациентов в этих городах были получены нозокомиальные микроорганизмы *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*.

Степень тяжести патологического процесса варьировала в городах. В г. Караганда регистрировались пациенты со второй, третьей и четвертой степенью тяжести процесса, в г. Атырау только с третьей и четвертой, в г. Алматы от первой до пятой. Возможно, это связано с различной

загруженностью отделений, возможностью госпитализации пациентов с Covid -19 на момент проведения исследования - период наивысшего пика заболеваемости.

Анализ распространения микроорганизмов по городам показан на рисунке 2. Статистически значимых различий в распространенности бактериальных возбудителей в образцах больных пневмониями из разных городов Казахстана выявлено не было. Однако классический возбудитель пневмоний *S.pneumoniae* был выделен только в образцах, полученных из г. Караганда.

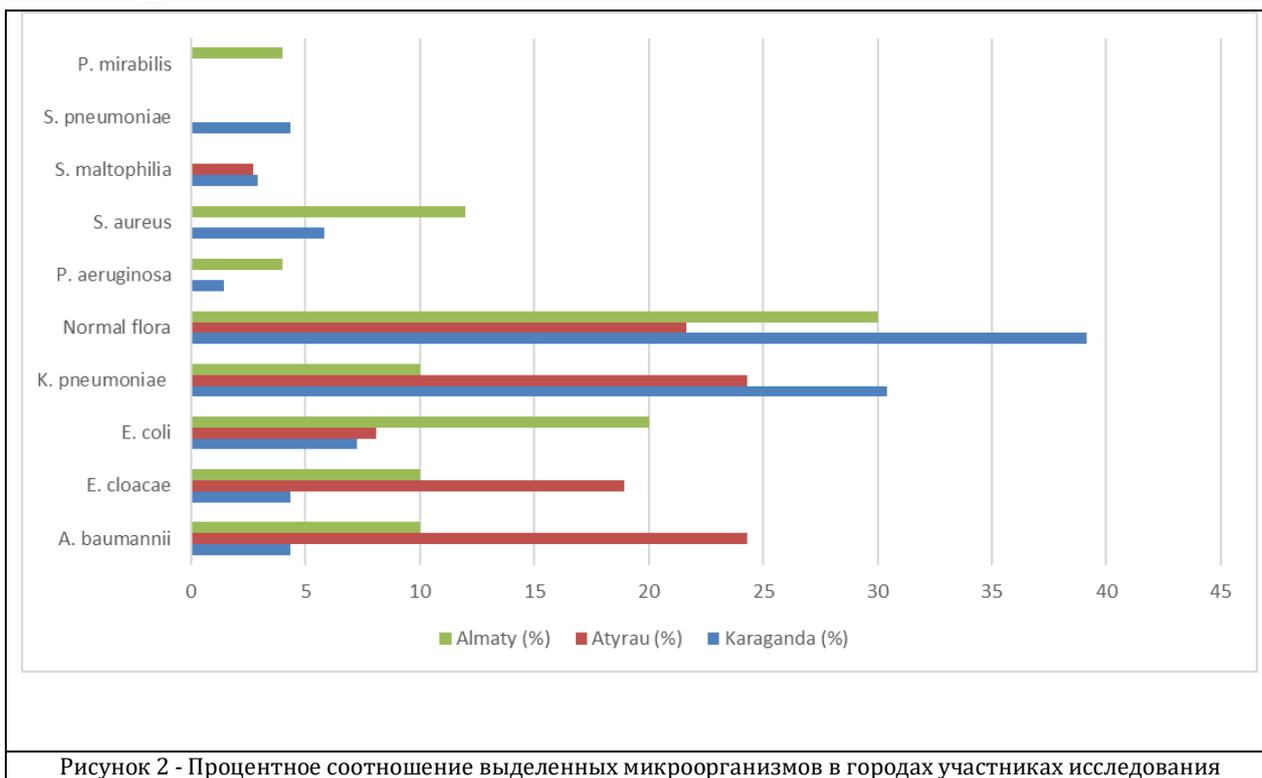


Рисунок 2 - Процентное соотношение выделенных микроорганизмов в городах участниках исследования

В нашем исследовании, часть пациентов на момент сдачи микробиологического исследования мокроты принимала антибактериальные препараты. Была получена взаимосвязь ($p=0,003$) между такими параметрами как применение антибактериальных препаратов и выделенной микрофлорой. Так, у пациентов, которые не принимали антибактериальных препаратов был получен нормальный рост микрофлоры ротовой полости, а также *K.pneumoniae* и *S.aureus*. У пациентов, которые принимали азитромицин и кларитромицин были получены - *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, у нескольких пациентов получен рост нормальной микрофлоры. У пациентов, которые принимали препараты группы фторхинолоны (левофлоксацин, ципрофлоксацин) - *K.pneumoniae*. *S.aureus* был получен от пациентов, которые принимали препараты группы карбапенемы - меропенем. *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae* регистрировались от пациентов, которые принимали амоксилав. У всех пациентов, принимавших

антибактериальные препараты зафиксирован рост грибов рода *Candida*.

Нозокомиальные штаммы *Stenotrophomonas maltophilia*, которые были получены из образцов г. Караганда, Атырау, характеризовались устойчивостью ко многим антибактериальным препаратам (β -лактамы, антибиотики, хлорамфеникол, тетрациклины). *Stenotrophomonas maltophilia* не отличалась от классической картины устойчивости больничного штамма - чувствительность лишь была сохранена к аминогликозидам и фторхинолонам. Остальные антимикробные препараты были неактивны в отношении резистентного микроорганизма. Штаммы классического возбудителя пневмоний *S.pneumoniae* характеризовались высоким уровнем устойчивости к фторхинолонам. Один штамм был устойчив к 14,15 членным макролидам, линкозамидам.

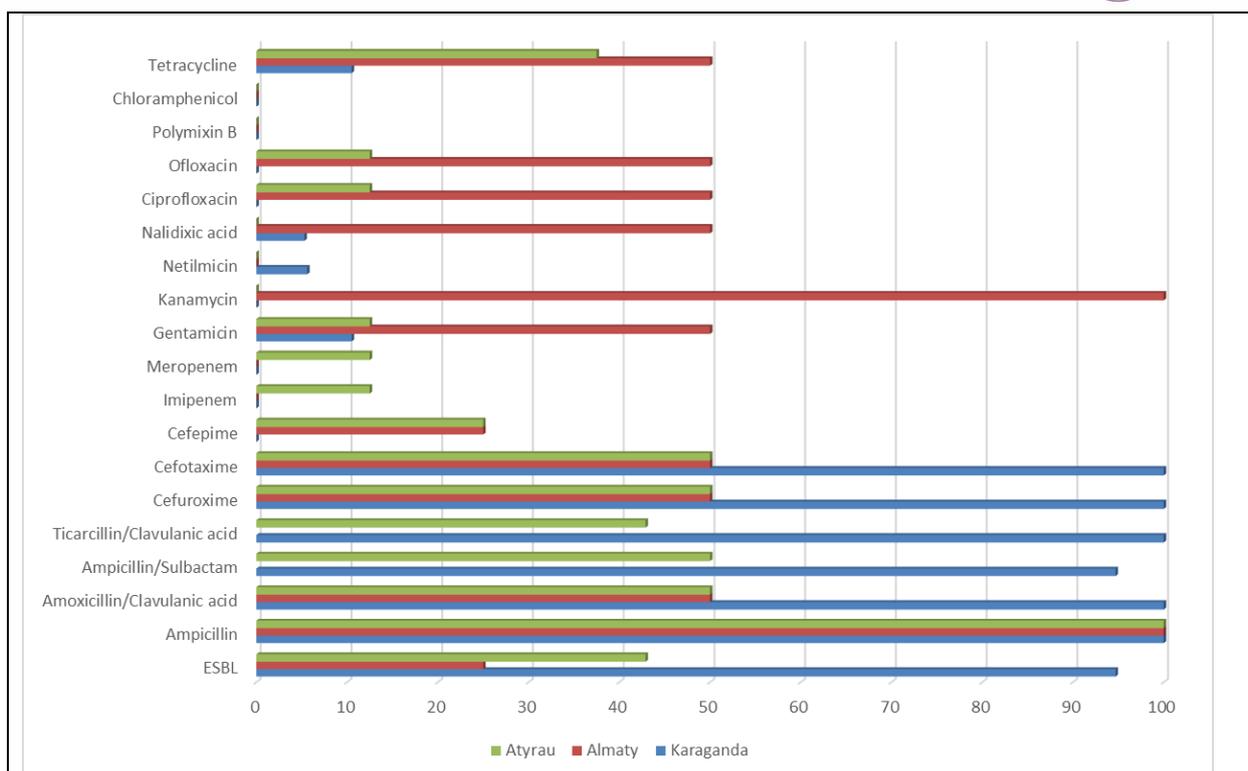


Рисунок 3 - Процент устойчивых *Klebsiella pneumoniae*

При оценке чувствительности к антимикробным препаратам *K.pneumoniae* наибольшее количество ESBL-продуцирующих штаммов было получено в г. Караганда (94,7%), штаммы, устойчивые к препаратам группы карбапенемов (имипенем, меропенем) были выделены в г. Атырау. 50% штаммов *K.pneumoniae*, выделенных в Алматы были устойчивы к фторхинолонам. Устойчивых штаммов к хлорамфениколу и полимиксину В (колистин) получено не было.

Чувствительность к другим группам антимикробных препаратов представлена на рисунке 3.

Штаммы *P.aeruginosa*, которые были получены из образцов г. Алматы и Караганды в целом характеризовались высокой чувствительностью к антимикробным препаратам, за исключением цефалоспоринов 2 и 3 поколения.

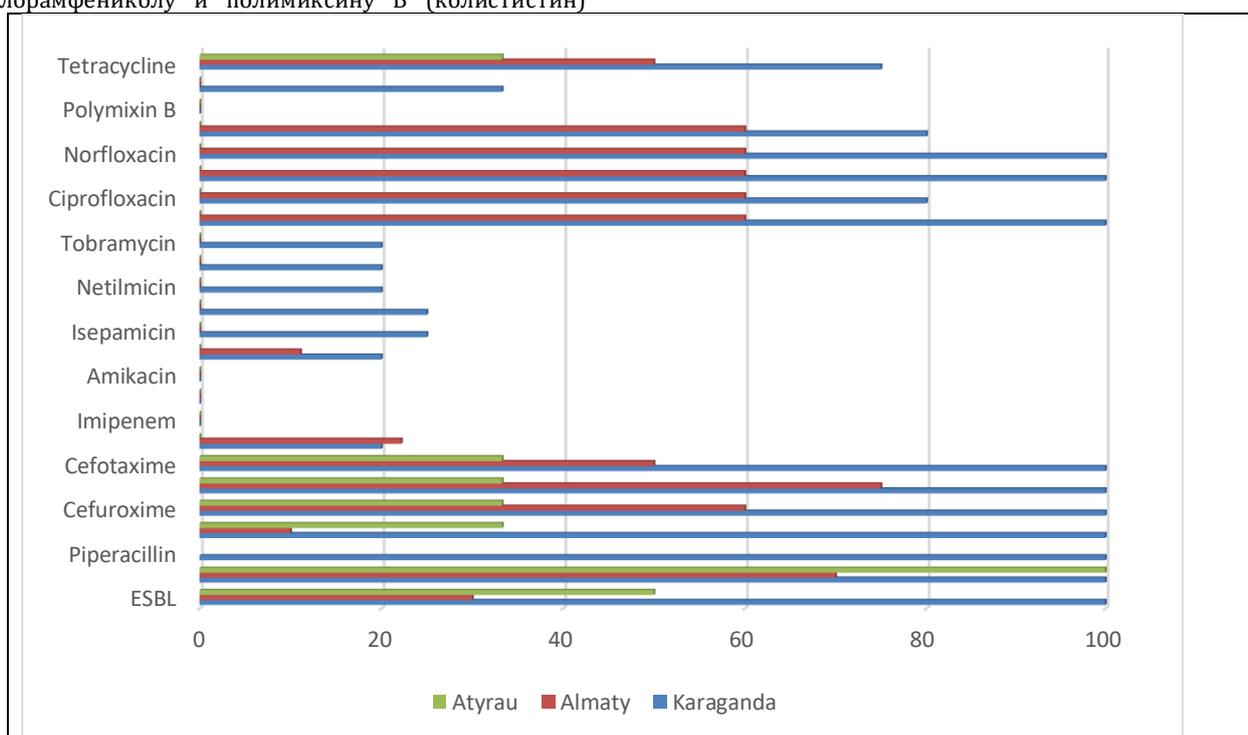


Рисунок 4 - Процент устойчивых *Escherichia coli*

Обращает на себя внимание картина чувствительности к антимикробным препаратам *E.coli* (рисунок 4). Штаммы, полученные в г. Караганда отличались наиболее высоким уровнем устойчивости к антибиотикам – это штаммы, которые продуцировали бета-лактамазы расширенного

спектра действия, а также были 100% устойчивы к препаратам группы фторхинолонов. 50% штаммов *E.coli*, выделенных из г. Атырау также относились к группе БЛРС. Штаммы *E.coli*, продуцирующие металло-бета-лактамазы, в исследуемых городах не были обнаружены.

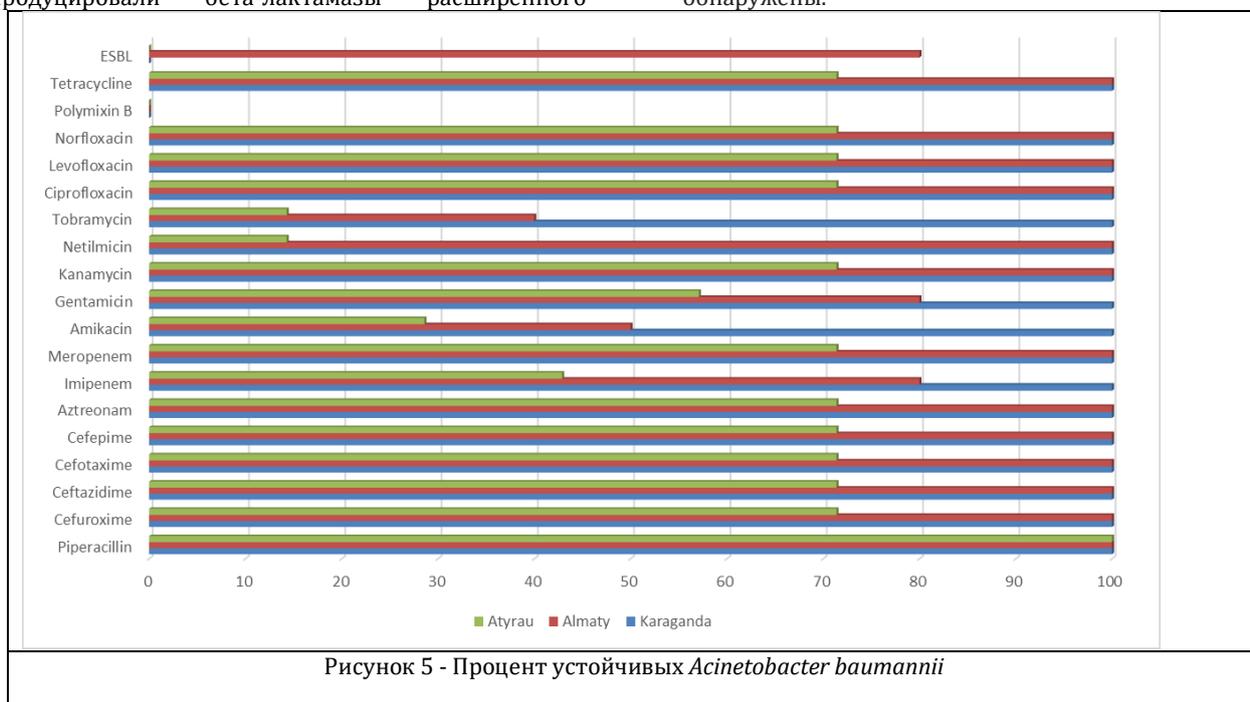


Рисунок 5 - Процент устойчивых *Acinetobacter baumannii*

Результаты тестирования на чувствительность к антимикробным препаратам продемонстрировали высокий уровень устойчивости изолятов *A. baumannii* ко всем протестированным антибиотикам, за исключением колистина в г. Караганда (рисунок 5). Выделенные *Acinetobacter baumannii* в г. Алматы характеризовались устойчивостью к бета-лактамам, антибиотикам, фторхинолонам, некоторым аминогликозидам. В 20% случаев чувствительность штаммов была сохранена к гентамицину, в 25% к амикацину. Штаммы *A. baumannii* были высокочувствительны к полимиксину/колистину. Картина чувствительности к антимикробным препаратам штаммов *Acinetobacter baumannii*, полученных из образцов в г. Атырау, отличалась картиной от идентичных штаммов, выделенных в других городах-участниках исследования. Штаммы обладали средним уровнем устойчивости к антимикробным препаратам – от 22,2% до 55,6% штаммов были устойчивы к аминогликозидам, 55,6% устойчивых микроорганизмов к карбапенемам и фторхинолонам. Высокую активность *A. baumannii*

была сохранена в отношении полимиксина/колистина. Устойчивые изоляты *A. baumannii* нередки среди госпитализированных пациентов и внутрибольничных инфекций и продолжают оставаться одной из серьезных проблем в системе здравоохранения [6]. В настоящем исследовании 50% штаммов *S. aureus* из г. Караганда были идентифицированы как MRSA (рисунок 6), а также были устойчивы к тетрациклину, азитромицину, гентамицину, ципрофлоксацину. Устойчивости к ванкомицину, рифампицину, фузидиевой кислоте, линезолиду не наблюдалось. 16,7% штаммов, полученных из образцов г. Атырау были устойчивы к тетрациклину и чувствительными ко всем остальным тестируемым антибиотикам. *S. aureus* играет важную роль при осложнении любой инфекции, особенно в условиях стационара. Многие исследования показывают, что инфекции нижних дыхательных путей, вызванные MRSA, могут быть связаны со значительным уровнем смертности у пациентов, поступающих в отделения интенсивной терапии [7-9].

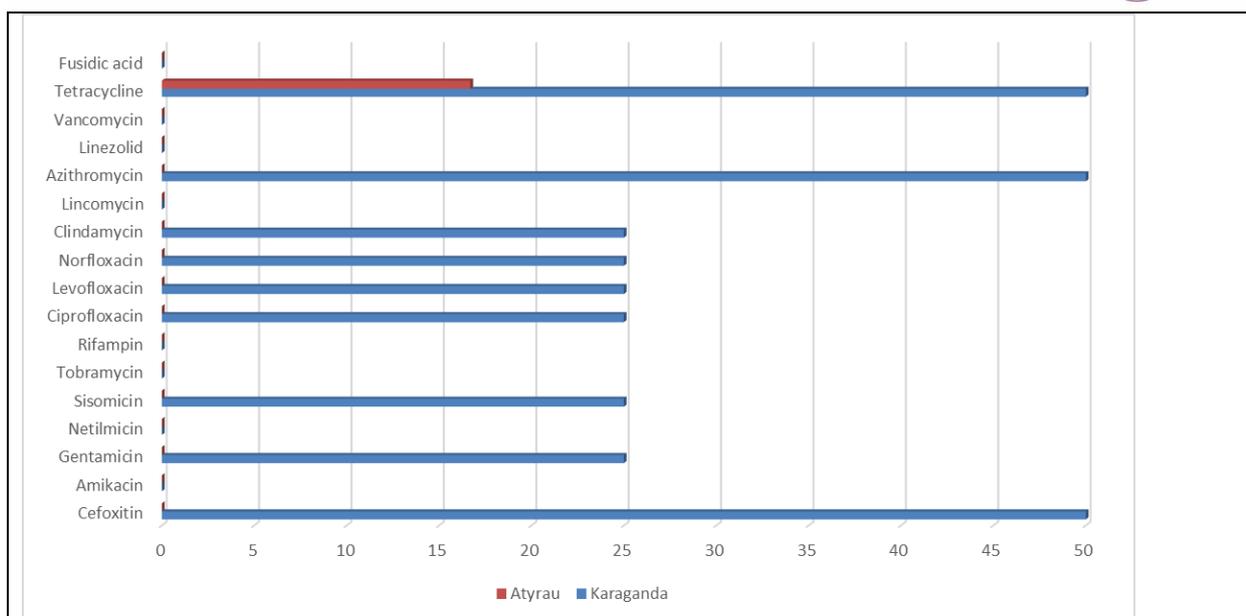


Рисунок 6 - Процент устойчивых *Staphylococcus aureus*

Различий в частоте встречаемости микроорганизмов, выявленных между группами пациентов с положительным и отрицательным COVID-19, не обнаружено. В период роста заболеваемости наблюдалось широкое распространение эмпирического назначения и использования антибиотиков широкого спектра действия для всех пациентов с подозрением на респираторные инфекции, вследствие чего возможно и была получена вышеописанная микрофлора [10].

Выводы

Наше исследование - одно из первых исследований, посвященных выявлению коинфекции при COVID-19 в Республике Казахстан во время пандемии.

Выделенные микроорганизмы этиологически значимы и являются микроорганизмами группы ESKAPE, в большинстве случаев получены в монокультуре, либо вместе с дрожжевыми грибами. Лидирующее место в общей этиологической структуре принадлежало *K.pneumoniae* – 22,64%, на долю *E. coli* пришлось 11,95% выделенных штаммов, в 11,32% случаев был выделен *A. baumannii*. В единичных случаях были выделены не менее важные микроорганизмы - *S.aureus*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*,

S. pneumoniae. Выделенные патогены показали высокую устойчивость к большинству протестированных антибактериальных агентов. Это может задержать процесс лечения и выздоровления с COVID-19, а также повысить уровень смертности [11, 12]. В проведенных ранее исследованиях указывается, что смертность у пациентов с COVID-19 увеличивается и может быть связана с сопутствующими бактериальными инфекциями [13,14]. Таким образом, рекомендуются дальнейшие исследования для подтверждения этого вывода.

Важно ограничить риск заражения и распространения устойчивых микроорганизмов путем точного контроля за внутрибольничными инфекциями и привлечения внимания к вторичным инфекциям, вызванным устойчивыми бактериями, которые могут повысить уровень смертности пациентов с COVID-19 [15].

Результаты исследования вызывают опасения по поводу чрезмерного использования противомикробных препаратов в амбулаторных условиях и возможности обострения проблемы устойчивости к антимикробным препаратам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Guideline for diagnosis and treatment “Coronavirus infection COVID-19 in adults”. Protocol No. 124 of Republic of Kazakhstan dated December 03, 2020.
 2 Langford B.J., So M., Raybardhan S. et al. Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis // Clin. Microbiol Infect. - 2020. - Vol. 26(12). - P. 1622-1629.
 3 Brundage J.F., Shanks G.D. Deaths from bacterial pneumonia during 1918-19 influenza pandemic // Emerg Infect Dis. - 2008. - Vol. 14(8). - P.1193-91202.
 4 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 13th ed. CLSI standard M02. ISBN 1-56238-835-5. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2018.

5 Rice L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE // J Infect Dis. - 2008. - Vol. 15.197(8) - P.1079-1081.
 6 Van T.D., Dinh Q.D., Vu P.D., et al. Antibiotic susceptibility and molecular epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex strains isolated from a referral hospital in northern Vietnam // J Glob Antimicrob Resist. - 2014. - Vol. 2(4). - P. 318-321.
 7 Thompson D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a general intensive care unit // J R Soc Med. - 2004. - Vol. 97(11). - P.521-526.
 8 Rello J., Torres A., Ricart M et al. Ventilator-associated pneumonia by *Staphylococcus aureus*. Comparison of methicillin-resistant and methicillin-sensitive episodes // Am J Respir Crit Care Med. - 1994. - Vol. 150(6 Pt 1). - P.1545-1549.



- 9 Bhat N., Wright J., Broder K. et al. Influenza-associated deaths among children in the United States, 2003-2004 // N Engl J Med. – 2005. – Vol. 353(24). P.2559-2567.
- 10 Rawson T.M., Moore L.S., Zhu N. et al. Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals With Coronavirus: A Rapid Review To Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing // Clin Infect Dis. – 2020. – Vol. 71(9). P. 2459-2468.
- 11 Zhou F., Yu T., Du R. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study // Lancet. – 2020. – Vol. 395(10229). - P.1054-62.
- 12 Lim Y.K., Kweon O.J., Kim H.R. et al. Impact of bacterial and viral coinfection in community-acquired pneumonia in

- adults // Diagn Microbiol Infect Dis. – 2019. – Vol.94(1). – P. 50–54.
- 13 Chen N., Zhou M., Dong X. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: A descriptive study // Lancet. – 2020. – Vol.395. – P. 507–513.
- 14 Guo L., Wei D., Zhang X. et al. Clinical Features Predicting Mortality Risk in Patients With Viral Pneumonia: The MuLBSTA Score // Front Microbiol. – 2019. – Vol. (10). – P. 2752.
- 15 Martins-Filho P.R., Tavares C.S., Santos V.S. Factors associated with mortality in patients with COVID-19. A quantitative evidence synthesis of clinical and laboratory data // Eur J Intern Med. – 2020. – Vol.76. P. 97–99.

А.В. Лавриненко, С. И. Колесниченко, А. А. Тұрмұхамбетова, И. А. ҚадYROVA

ҰАК КЕАҚ ұжымдық пайдалану зертханасы

SARS-COV-2-МЕН БАЙЛАНЫСТЫ ПНЕВМОНИЯ

Мақалада сипатталған зерттеу-пандемия кезінде Қазақстан Республикасында COVID-19 кезінде коинфекцияны анықтауға арналған алғашқы зерттеулердің бірі. Оқшауланған микроорганизмдер этиологиялық тұрғыдан маңызды және ESCAPE тобының микроорганизмдері болып табылады, көп жағдайда монокультурада немесе ашытқы

саңырауқұлақтарымен бірге алынады. Оқшауланған қоздырғыштар сыналған Бактерияға қарсы агенттердің көпшілігіне жоғары қарсылықты көрсетті.

Түйінді сөздер: COVID-19, антибиотиктерге төзімділік, ESCAPE.

A.V.Lavrinenko, S.I.Kolesnichenko, A.A.Turmukhambetova, I.A.Kadyrova

The Shared Laboratory

BACTERIAL CO-INFECTIONS WITH SARS-COV-2.

Resume: *The study described in the article is one of the first studies dedicated to identify COVID-19 patients' bacterial coinfection in the Republic of Kazakhstan during a pandemic period. The isolated microorganisms are etiologically significant and belong to the ESCAPE group, in*

most cases obtained in monoculture, or in association with Candida fungi. Dedicated pathogens showed high resistance to most antimicrobial agents.

Keywords: *COVID-19, antibiotic resistance, ESCAPE.*