

ПРОБЛЕМЫ СИНЕГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИИ: ОТ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ К МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ



М.В. Кузнецова,
кандидат биологических наук,
научный сотрудник,
Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН



Т.И. Карпунина,
доктор биологических наук,
профессор кафедры
микробиологии и вирусологии,
Пермская государственная
медицинская академия
им. ак. Е.А. Вагнера

Представлен опыт использования молекулярно-генетических методов в лабораторной диагностике и мониторинге инфекций, обусловленных *Pseudomonas aeruginosa*. Показана актуальность исследований по вопросам идентификации/детекции штаммов синегнойной палочки, выявления механизмов антибиотикоустойчивости, типирования госпитальных изолятов с целью определения их родства и источника происхождения.

К особенностям современного этапа развития инфекций относится увеличение в их структуре числа заболеваний, вызываемых представителями многочисленных групп условно патогенных бактерий. При этом спектр возможных возбудителей гнойно-септических инфекций (ГСИ) постоянно пополняется за счет микроорганизмов, входящих в состав нормальной микрофлоры, либо свободно живущих таксонов [1]. Лабораторная диагностика при расшифровке оппортунистической инфекции имеет свои особенности, требуя ответа на вопрос: является ли изолируемый микроорганизм причинным фактором либо имеет место транзитное бактерионосительство. Решение эпидемиологических задач невозможно без определения родства штаммов, циркулирующих в стационаре, доказательства их принадлежности к госпитальному (рис. 1). Учитывая такую тенденцию, необходимо наряду с традиционными разрабатывать новые подходы к бактериоло-

гической диагностике. «Классические» методы идентификации и типирования возбудителей ГСИ базируются на изучении фенотипических характеристик изолируемых культур. Так как геном бактерий представляет собой наиболее фундаментальный «элемент идентичности» клеток, в последние годы наблюдается тенденция к более широкому привлечению молекулярно-генетических методов для идентификации клинических изолятов, определения их факторов патогенности и выявления детерминант антибиотикорезистентности [3]. Генетические подходы с успехом используются и в эпидемиологическом анализе при определении источника и степени родства изучаемых штаммов [12].

Pseudomonas aeruginosa – один из самых распространенных возбудителей внутрибольничных инфекций, создающий серьезные проблемы в стационарной медицинской практике, особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии

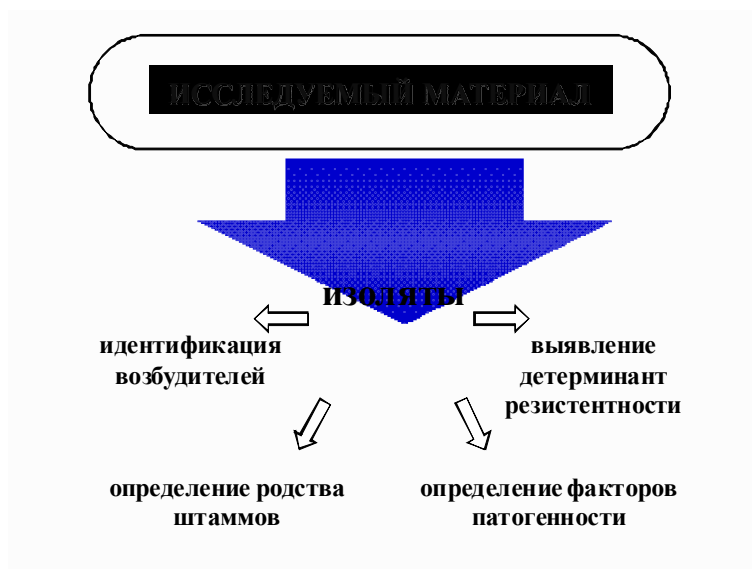


Рис. 1. Основные направления лабораторной диагностики госпитальных инфекций

(ОРИТ) [4]. Синегнойная палочка является возбудителем поздних вентиляционных пневмоний, инфекций мочевых путей, катетер-ассоциированных ангиогенных инфекций, бактериемии, раневых инфекций, инфекций глаз, ожоговых ран [11]. Доля *P. aeruginosa* в структуре возбудителей нозокомиальных инфекций у взрослых составляет в среднем 11–13,8 %. По данным 2004 г. United States Cystic Fibrosis Foundation Patients Registry, *P. aeruginosae* составляют 57,3 % всех респираторных культур, выделенных от пациентов с фиброзом легких в случае хронических и персистирующих инфекций. Данный возбудитель играет ведущую роль в этиологии септицемии при первичных иммунодефицитах, а также в 20 % случаев является причиной бактериемии у пациентов с лейкопенией [6].

Наш интерес к изучению синегнойной инфекции обусловлен не только ее широким распространением, но и увеличением в последние годы доли *P. aeruginosa* в спектре возбудителей внутрибольничных осложнений в стационарах различного

профиля. Анализ сводных статистических данных бактериологической службы г. Перми в 2006–2010 гг. позволил установить среднемноголетний уровень инфицированности *P. aeruginosa*: $15,2 \pm 0,4$ на 1000 обследованных. Наблюдается тенденция к увеличению инфицированности *P. aeruginosa*. Вместе с тем частота обнаружения данного возбудителя в бактериологических лабораториях колебалась в широких пределах (таблица). Причины таких значительных колебаний не могут исчерпываться лишь профилем стационара и структурой исследуемого клинического материала.

Идентификация *P. aeruginosa* в практических бактериологических лабораториях осуществляется культуральным методом (приказ МЗ РФ № 535 от 22.04.85). Нами был проведен сравнительный анализ результатов традиционных бактериологических и молекулярно-генетических методов для идентификации *P. aeruginosa*. Первичная идентификация проведена в бактериологических лабораториях ЛПУ. Реидентификацию осуществляли с



Результативность обнаружения *P. aeruginosa* в бактериологических лабораториях в 2006–2010 гг. (количество штаммов на 1000 обследованных)*

Лаборатория	2006 г.	2007 г.	2008 г.	2009 г.	2010 г.
ЛПУ № 1	17,1±3,3	18,3±3,7	31,9±5,3 ^{1,2}	33,7±5,4 ¹	0
ЛПУ № 2	20,3±2,6	13,5±2,1 ¹	12,3±2,1 ¹	16,4±1,8 ^{1,2}	14,7±2,2 ¹
ЛПУ № 3	10,7±1,5	13,0±1,3 ¹	30,2±2,3 ^{1,2}	10,3±1,5 ²	12,6±1,7
ЛПУ № 4	23,2±2,3	25,9±2,6	26,0±2,5	30,7±3,0 ^{1,2}	23,6±3,0 ²
ЛПУ № 5	55,0±4,3	37,5±3,8 ¹	0	48,3±3,3 ¹	26,7±1,8 ^{1,2}
ЛПУ № 6	8,5±1,1	4,7±0,7 ¹	4,9±0,7 ¹	4,1±0,6 ¹	9,2±0,9 ²
ЛПУ № 7	11,6±1,4	7,0±1,0 ¹	7,5±1,0 ¹	7,1±1,0 ¹	0
ЛПУ № 8	9,3±4,2	6,3±2,5	6,5±2,3	6,7±2,4	–
ЛПУ № 9	18,9±1,9	15,4±1,5 ¹	19,0±1,8 ²	13,5±1,6 ^{1,2}	–

Примечание: *данные предоставлены главным бактериологом г. Перми Н.С. Авдеевой; ¹ – различия достоверны при сравнении с 2006 г.; ² – различия достоверны при сравнении с предыдущим годом.

помощью «НефермТеста24» (Lachema, Чехия). Для генетической детекции применяли полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с родо- и видоспецифичными праймерами к генам 16S рРНК *Pseudomonas* spp. (фрагмент 969 п.н.) и *P. aeruginosa* (фрагмент 956 п.н.) [10] и секвенирование. В результате генетической идентификации синегнойной палочки было установлено, что 95 % (151) штаммов соответствуют виду, определенному в первичных бактериологических лабораториях. По результатам ПЦР-анализа 3,1 % (5) культур являются псевдомонадами, но не *P. aeruginosa*, и только 3 (1,9 %) – не принадлежали к роду *Pseudomonas* (рис. 2). Высокий процент совпадений указывает на адекватность культурального метода при идентификации *P. aeruginosa*.

Однако к настоящему времени накапливаются сведения о недостаточной информативности бактериологической диагностики синегнойной инфекции, что исследователи связывают с биологическими особенностями возбудителя. Это, в первую очередь, наблюдается в случаях, когда изоляты теряют способность к пигментообразованию, продукции экзополисахарида и рамнолипида [9]. Идентификацию затрудняет и присутствие в материале других неферментирующих грамотрицательных бактерий, в том числе рода *Pseudomonas*. Особенно часто «недодиагностика» снижает эффективность эпидемиологического контроля при мониторинге госпитальных штаммов за счет малой концентрации микроорганизмов в исследуемом материале, формирования ими

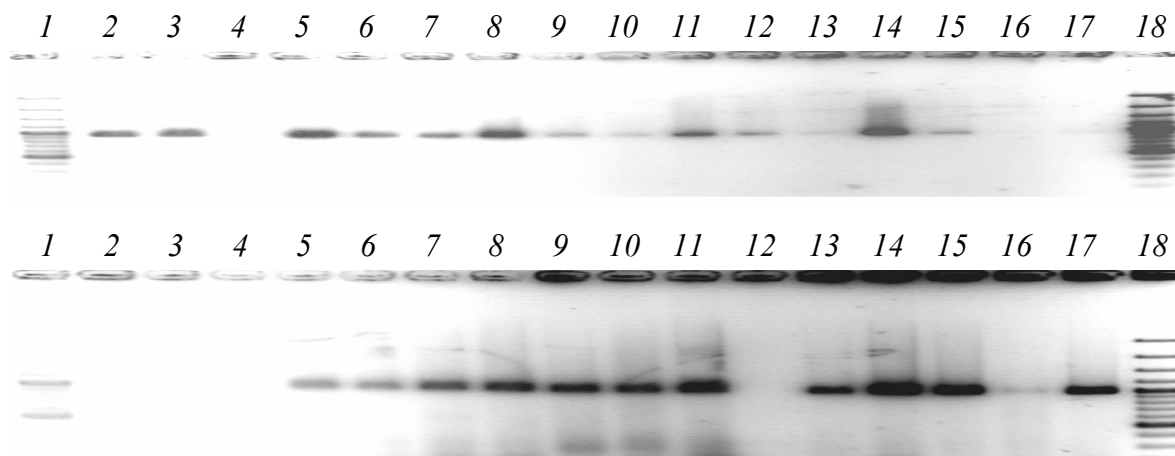


Рис. 2. Пример электрофореграммы продуктов амплификации генов 16S рРНК с родоспецифичными (верх) и видоспецифичными праймерами (низ): 1, 18 – маркер молекулярных масс 1кбDNA Ladder; 2–17 – изоляты *P. aeruginosa*

биопленок или покоящихся форм, не выявляемых бактериологическим методом. При проведении контроля обсемененности объектов внешней среды грамотрицательными неферментирующими бактериями в общем отделении одного из инфекционных стационаров прямые высевы на селективные среды не дали положительного результата. С помощью молекулярно-генетического анализа установлено, что в одной из проб, взятой в отделении, присутствуют бактерии рода *Pseudomonas*. В ряде случаев решающее значение может иметь и продолжительность проведения анализа. Так, при проведении контроля микробной обсемененности окружающей среды в хирургическом отделении другой больницы методом ПЦР был получен положительный результат в течение одного рабочего дня. Бактериологическое исследование подтвердило наличие в пробе бактерий *P. aeruginosa*, однако на это потребовалось 3 дня.

ся препаратами выбора в терапии тяжелых инфекций, вызванных *P. aeruginosa* [4]. Наиболее распространенными механизмами резистентности к карбапенемам у *P. aeruginosa* являются: мутации и, как следствие, снижение поступления антибиотика в бактериальную клетку, активное выведение антибиотика из клетки и ферментная инактивация. Последний механизм может реализовываться с помощью бета-лактамаз различных молекулярных классов: ферментами класса А (GES, KPC), D (OXA-50) и металло-бета-лактамазами класса В (VIM, IMP и др.) [7, 8]. Для *P. aeruginosa* описано пять основных групп металло-бета-лактамаз. Все они содержат по два атома цинка и различаются аминокислотными последовательностями. Гены, кодирующие большую часть этих ферментов, в составе генных каскадов включены в различные мобильные элементы, в основном интегроны 1-го класса (рис. 3).

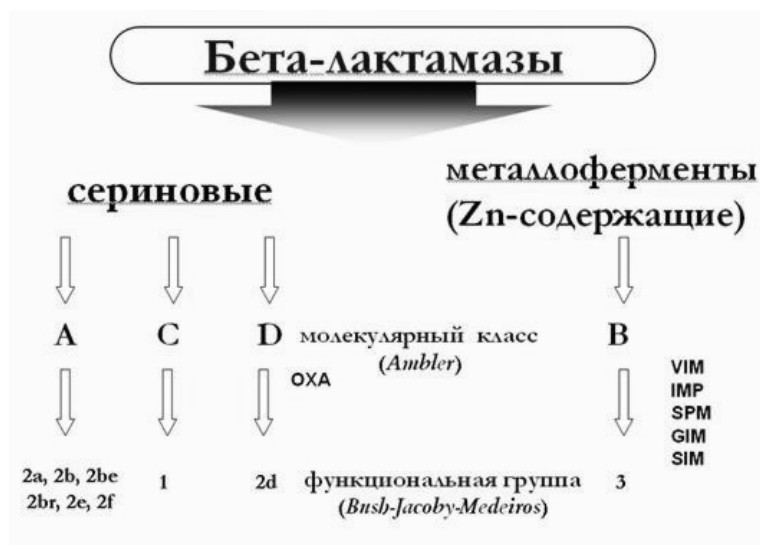


Рис. 3. Классификация бета-лактамаз (М.В. Эйдельштейн, 2001)

Выявление лекарственной устойчивости. Среди большого круга проблем, связанных с резистентностью госпитальных штаммов *P. aeruginosa* к широкому спектру антибактериальных препаратов, наиболее значимой является их устойчивость ко многим бета-лактамам антибиотикам (БЛА). Особую опасность представляет резистентность синегнойной палочки к карбапенемам – меропенему и имипенему, которые наряду с другими «антисинегнойными» средствами являют-

В результате изучения устойчивости к карбапенемам 178 штаммов *P. aeruginosa*, изолированных в разных стационарах, выявлено, что подавляющее большинство резистентных культур выделено из ОРИТ хирургических стационаров. В учреждении родовспоможения и детских стационарах циркулируют преимущественно чувствительные изоляты. Доля меропенемоустойчивых штаммов синегнойной палочки в целом составила 42,5 %, имипенемоустойчивых – превысила половину.

К обоим антибиотикам нечувствительны 35,4 % *P. aeruginosa* [2].

Проведен скрининг генов металло-бета-лактамаз и оксациллиназ методом ПЦР. Анализ генов и поиск гомологичных последовательностей осуществляли, используя программы BLAST и базы данных GenBank. Продуценты металло-бета-лактамаз составили 19,1 % от всех и 30,3 % от карбапенемоустойчивых культур. Установлено, что в геноме данных штаммов присутствуют гены *bla*_{VIM-2}. Сравнительный анализ определенных аминокислотных последовательностей бета-лактамаз изученных штаммов позволил определить их в группу VIM-2-подобных ферментов (рис. 4). Необходимо отметить, что из 42 штаммов, изолированных от пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) хирургических стационаров, 16 (38 % !)

продуцировали VIM-2 металло-бета-лактамазы. В то же время в детских и родовспомогательных учреждениях не было выявлено ни одного подобного штамма.

Специфичная амплификация с праймерами к гену *bla*_{OXA-50} (фрагмент 869 п.н.) обнаружена только у 12 (13,2 %) штаммов *P. aeruginosa*, изолированных из хирургических стационаров «взрослой» клиники, тогда как в детских ЛПУ, включая и родильные стационары, – у 27 (31 %) изолятов. Сравнение нуклеотидных последовательностей изучаемых генов у ряда штаммов выявило, что 5 изолятов имеют последовательность *bla*_{OXA-50c} и один – *bla*_{OXA-0g}. Большая часть штаммов *P. aeruginosa*, циркулирующих в детской клинике, имеет последовательности, на 100 % идентичные гену *bla*_{poxB} (*bla*_{OXA-50-like}) *P. aeruginosa* MF 6.

Таким образом, использование молекулярно-генетических методов исследования в изучении механизмов устойчивости штаммов *P. aeruginosa* к карбапенемам выявило, что в ОРИТ хирургических стационаров циркулируют преимущественно продуценты VIM-2-подобных ферментов, в детских – продуценты оксациллиназ. Эти данные имеют большое практическое значение в связи с тем, что локализация генов металло-бета-лактамаз на мобильных носителях приводит к быстрому распространению последних среди клинически значимых микроорганизмов и можно ожидать роста устойчивости к карбапенемам госпитальной синегнойной палочки в ОРИТ «взрослых» ЛПУ. Более благоприятная ситуация отмечена в детских и родовспомогательных лечебных учреждениях.

Генотипирование возбудителей ГСИ. В настоящее время молекулярно-генетические методы широко используются для подвидового типирования и анализа генетического родства (клональности) выделенных штаммов микроорганизмов, что особенно ценно при проведении эпидемиологических исследований [5]. Один из первых и наиболее общий подход основан на использовании праймеров, имеющих множественную локализацию в геноме. Чаще всего используется один

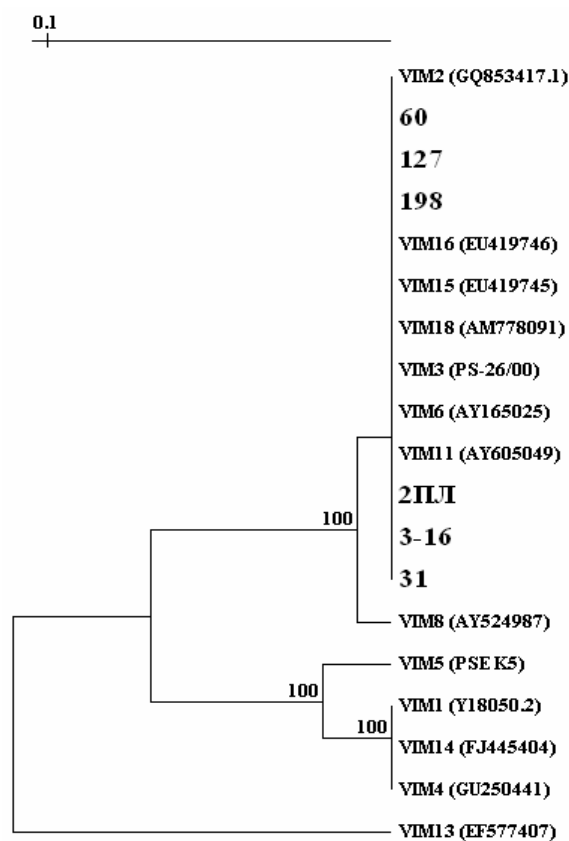


Рис. 4. Древо сходства нуклеотидных последовательностей полных генов металло-бета-лактамаз (группа VIM) бактерий рода *Pseudomonas*, построенное методом UPGMA: жирным шрифтом выделены анализируемые нозокоммиальные штаммы *P. aeruginosa*. В скобках указаны номера последовательностей, депонированных в GenBank, или обозначение штамма

короткий праймер с произвольной, случайной последовательностью. Этот метод был предложен независимо двумя группами исследователей и получил название RAPD-ПЦР (Random Amplified Polymorphic DNA) или AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) [12, 13].

Первые попытки использовать вышеописанные технологии генотипирования были предприняты нами в 2006 г. в клинико-эпидемиологическом анализе госпитального сепсиса, ассоциированного с *P. aeruginosa*, в инфекционном стационаре. Для подтверждения нозокомиальной природы изолированных бактериальных культур был применен метод RAPD-ПЦР. Путем сопоставления электрофоретических профилей установлено, что RAPD-спектры изученных образцов были идентичны.

Позднее провели углубленные динамические исследования культур *P. aeruginosa* с целью изучения распространения носительства синегнойной палочки в одном из акушерских стационаров и двух детских больницах. Было изучено 114 культур *P. aeruginosa*, изолированных от детей, и 12 культур с объектов больничной среды. Важной клинической и эпидемиологической задачей явилось определение генотипа различных штаммов синегнойной палочки. В результате генотипирования штаммов *P. aeruginosa* выделено три геномварианта (рис. 5). Штаммы оценены как близкородственные и, скорее всего, являлись результатом персистенции «модального» штамма в акушерском стационаре с дока-

занным распространением в детские больницы.

На основании результатов анализа эпидемиологических данных, фено- и генетического типирования культур *P. aeruginosa* был разработан необходимый комплекс противоэпидемических мероприятий. К настоящему времени создана база данных «генетических паспортов» штаммов *P. aeruginosa*, выделенных в лечебно-профилактических учреждениях г. Перми, которая постоянно пополняется.

Таким образом, опыт сотрудничества специалистов кафедры микробиологии и вирусологии ПГМА, лаборатории химического мутагенеза ИЭГМ УрО РАН и врачей-бактериологов, в том числе из созданной в 2009 г. референс-лаборатории, позволяет констатировать, что молекулярно-генетические методы не могут заменить методы «классической бактериологии», которые совершенно правомерно и успешно используются в рутинной лабораторной практике. Вместе с тем очевидны преимущества ПЦР диагностики на этапе скрининга, при решении вопросов эпидемиологической направленности, в сложных, зачастую «арбитражных» ситуациях внутрибольничного инфицирования. Все это подтверждает целесообразность и эффективность комплексного подхода с привлечением как традиционных бактериологических, так и молекулярно-генетических методов в решении задач диагностики внутрибольничных инфекций и проведении мониторинга возбудителей ГСИ.

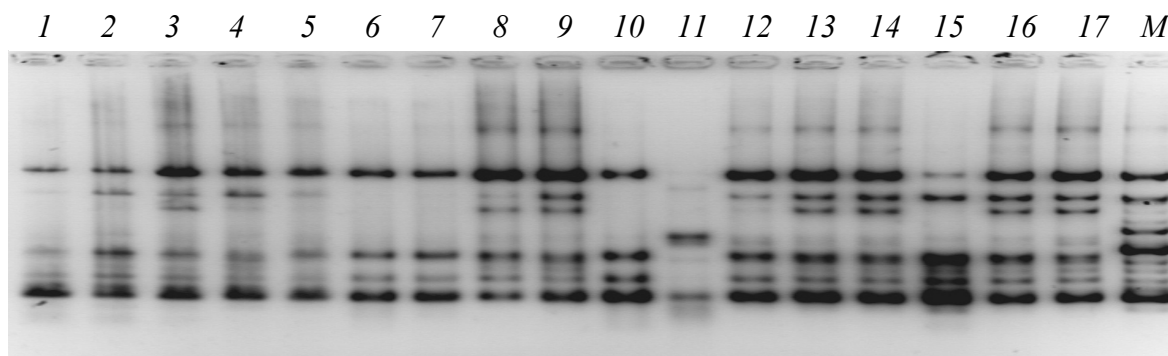


Рис. 5. Пример электрофоретического анализа продуктов RAPD-ПЦР с использованием праймера M13; 1–17 – изоляты, выделенные от новорожденных, M – маркер молекулярных масс 1кб DNA Ladder

Библиографический список:

1. Зуева Л.П., Яфаев Р.Х. Эпидемиология. – СПб: изд-во «Фолиант», 2005. – 752 с.
2. Кузнецова М.В., Карпунина Т.И., Егорова Д.О., Плотникова Е.Г., Демаков В.А. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2010. – Т. 12. – № 3. – С. 246–251.
3. Лопухов Л.В., Эйдельштейн М.В. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2000. – Т. 2. – № 3. – С. 9–100.
4. Решедько Г.К., Рябкова Е.Л., Фаращук А.Н., Страчунский Л.С. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2006. – 8 (3). – С. 243–59.
5. Шагинян И.А. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2000. – Т. 2. – № 3. – С. 82–95.
6. Bergen G.A., Shelhamer J.H. // Infect. Dis. Clin. North. Am. – 1996. – Vol. 10. – P. 297–326.
7. Bush K., Jacoby G.A. // Antimicrob. Agents. Chemother. – 2010. – Vol. 54. – P. 969–976.
8. Hall L.M.C., Livermore D.M., Gur D. et al. // Antimicrob. Agents. Chemother. – 1993. – Vol. 37. – P. 1637–1644.
9. Lyczak J.B., Cannon C.L., Pier G.B. // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15. – P. 194–222.
10. Spilker T., Coenye T., Vandamme P., LiPuma J.J. // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42. – P. 2074–2079.
11. Van Delden C., Igewski B. // Emerg. Infect. Dis. – 1998. – Vol. 4. – P. 551–560.
12. Welsh J., McClelland M. // Nucleic. Acids. Res. – 1990. – Vol. 18(24). – P. 7213–7218.
13. Williams I., Kubelik A.R., Livak K.I et al. // Nucleic. Acids. Res. – 1990. – Vol. 18(22). – P. 6531–6535.