

Фенотипические характеристики штаммов *Pseudomonas Aeruginosa*, изолированных в стационарах хирургического профиля

М.В. Кузнецова, к.б.н., н.с. ИЭГМ УрО РАН Н.В. Николаева, аспирант кафедры микробиологии и вирусологии ГОУ ВПО «ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Росздрава» А.В. Касатов, к.м.н., доцент кафедры госпитальной хирургии ГОУ ВПО «ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Росздрава» Т.И. Карпунина, д.м.н., профессор кафедры микробиологии и вирусологии ГОУ ВПО «ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Росздрава»

Phenotypes of *pseudomonas aeruginosa* strains, isolated in surgical clinics

M.V. Kuznetsova, N.V. Nicolaeva, A.V. Kasatov, T.I. Karpunina

Резюме

В результате изучения 83 штаммов *P. aeruginosa*, выявлена фенотипическая гетерогенность (по фосфолипазной, пленкообразующей способности, антибиотикорезистентности и др.) популяций синегнойной палочки в различных отделениях одного многопрофильного, а также в разных хирургических стационарах г. Перми. Установлено, что штаммы, изолированные из ОРИТ, характеризуются наиболее широким набором экспрессируемых факторов патогенности и выраженной множественной лекарственной устойчивостью. Сходство или различие фенотипических характеристик изолятов *P. aeruginosa*, проявление которых в значительной степени индуцибельно, не позволяют однозначно оценить вероятность миграции штаммов, изолированных в ОРИТ, в другие отделения многопрофильного хирургического стационара, поскольку не ясно, обусловлена ли гетерогенность популяций синегнойной палочки модификационной изменчивостью или их отличия закреплены в геноме. Перманентно сохраняющиеся условия и типичные контингенты специализированных отделений способствуют формированию среди изолируемых в них культур профилированных фенотипов.

Ключевые слова: *P. aeruginosa*, антибиотикоустойчивость, факторы вирулентности

Resume

After studying of 83 strains of *P. aeruginosa* we revealed the phenotypic heterogeneity (in phospholipase activity, biofilm-forming capacity, resistance to antibiotics et al.) of bacterial populations both in different departments within one multi-specialized clinic and in different surgical clinics. We determined, that strains, isolated from intensive care unit, have the largest number of expressive pathogenic factors and high multiple drug resistance. The likeness or difference of phenotypic characteristics of *P. aeruginosa*, which is inductive, don't let us estimate definitely the possibility of strain migration from the intensive care unit into another departments of the multi-specialized clinic, as we don't know clearly if the heterogeneity of population of *P. aeruginosa* is conditioned by modified variability or its differences are fixed in the genome. Permanently preserved conditions and typical contingent of patients in specialized departments contribute to the forming of profiled phenotypes among the isolated strains.

Key words: *P. aeruginosa*, antibiotic resistance, virulent factors

Инфекции, вызываемые *P. aeruginosa*, являются, прежде всего, распространенными госпитальными инфекциями, то есть возникают у ослабленных больных с тяжелой соматической или хирургической патологией [1, 2]. Синегнойная палочка не поражает здоровые ткани, но в случае их повреждения или другого снижения защитных функций организма, этот возбудитель, не обладающий тропизмом и избирательностью при колонизации субстратов, может вызвать инфекционный процесс практически в любом органе [3]. Помимо факторов естественной резистентности макроорганизма решающее значение при этом имеет набор патогенных свойств возбудителя. В отличие от подавляющего большинства представителей неферментирующих бактерий синегнойная палоч-

ка обладает многочисленными факторами патогенности [4, 5]. Во внешней среде большинство из них не реализуются, но при попадании бактерий во внутреннюю среду организма запускается их активный синтез. Учитывая индуцибельность многих процессов, осуществляемых *P. aeruginosa*, прогнозировать течение инфекции, обусловленной этим микроорганизмом, крайне сложно. К тому же популяции синегнойной палочки гетерогенны по способности к синтезу и секреции факторов патогенности. По-видимому, на экспрессию вирулентных свойств оказывают влияние как индивидуальные особенности взаимодействия макроорганизма и бактерий, так и условия внешней (внутрибольничной) среды [6]. В стационарах селективное воздействие антибиотиков ускоряет процесс эволюции *P. aeruginosa*, где формируются полирезистентные бактериальные популяции [7]. Учитывая то, что гены лекарственной устойчивости часто обнаруживаются в ассоциациях с детерминантами факторов патогенности (например, гемолизина), полирезистентные бактерии обыч-

Ответственный за ведение переписки -

Т.И. Карпунина

г. Пермь, 614000, ул. Куйбышева, 39,

karpuninapsma@mail.ru, tar@iegm.ru

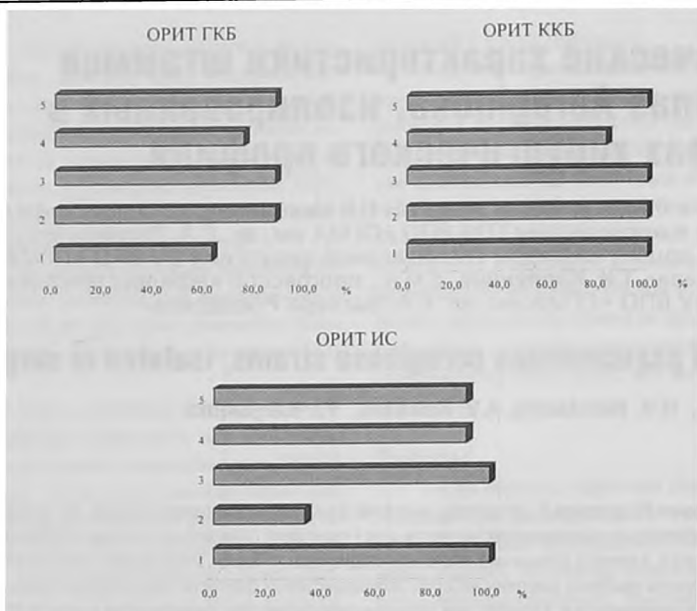


Рисунок 1. Антибиотикорезистентность штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из ОРИТ различных ЛПУ: 1 – цефтазидим; 2 – цефепим; 3 – имипенем; 4 – амикацин; 5 – ципрофлоксацин.

но более вирулентны и обладают значительной способностью к распространению [8].

Вопрос о своеобразии фенотипов штаммов, которые циркулируют в определенном отделении/стационаре остается дискуссионным. Тем не менее, информация о свойствах изолируемого штамма, включая антибиотикофенотип, позволяет оценить его патогенный потенциал, определить принадлежность к госпитальному, скорректировать врачу тактику лечения пациентов и проведения профилактических мероприятий.

Цель настоящего исследования – оценить фенотипические характеристики, определяющие патогенный потенциал клинических штаммов *P. aeruginosa*, в зависимости от профиля стационара.

Материалы и методы

Исследовано 83 штамма, изолированных в период январь-май 2009 г. от больных крупными хирургическими стационарами г. Перми (табл. 1), в том числе 35 штаммов из раневого отделяемого, 25 – из мокроты и 23 – из содержимого кишечника. При определении антибиотикочувствительности оценку зон ингибирования роста бактерий осуществляли в соответствии с МУК 4.2.1890-04 [9]. Образование биопленок изучали на поверхности 96-луночного полистиролового планшета согласно И.А. Шагиану [10]. Пленкообразующими считали культуры, если значения ОП580 превышали контроль в 8-10 раз, склонными к адгезии – в 3-7 раз, остальные оценивали как не способные к пленкообразованию. Гемолитическую активность (ГА) определяли на 5 % кровяном агаре после 24 ч инкубации по величине зоны просветления вокруг колоний исследуемых штаммов. Фосфолипазную актив-

ность (ФЛА) изучали на желточном агаре (желток куриного яйца разводили в 150 мл физиологического раствора и добавляли 5 % по объему к стерилизованному и охлажденному до 40-45°C питательному агару ЛуриаБертани). Гидролиз эскулина оценивали по результатам «Неферм-Теста 24» («Lachema»).

Результаты и обсуждение

Установлено, что значительный процент культур *P. aeruginosa* составляли полирезистентные штаммы, доля которых в ГКБ составила 86,2 %, в ОРИТ ККБ – 100 %, и ИС – 89,5 %.

Изоляты разных отделений многопрофильного стационара (ГКБ) различались по спектру чувствительности, и в первую очередь в отношении препаратов, рекомендованных для лечения синегнойной инфекции (табл. 2). Доля устойчивых вариантов ко всем исследованным антибиотикам из ЭХО была существенно меньше, чем в специализированных отделениях. Исключение составила чувствительность к цефалоспину 3 поколения – цефтазидиму, который, по-видимому, чаще других используется в отделении общего профиля (доля резистентных в ЭХО – 80,0 %, ТХО – 55,6 %, в ОРИТ – 62,5 %). Использование современных антимикробных препаратов в торакальной, кардиохирургии и реанимации привело к тому, что к цефепиму, имипенему и ципрофлоксацину были устойчивы более 85 % всех изолированных культур из ТХО, ОССХ, ОРИТ, а штаммы кардиососудистого отделения оказались не чувствительными ко всем антисинегнойным препаратам взятого спектра. С учетом описанной ко-резистентности псевдомонад к имипенему и амикацину [11], обращал на себя внимание тот факт, что в ТХО,

наряду со 100 % резистентностью к имипенему, только 33,3 % культур были устойчивы к амикацину. К гентамицину были устойчивы все изоляты из трех отделений.

В отделении реабилитации специализированного хирургического стационара (ИС) к имипенему и ципрофлоксацину были чувствительны 42,9 % культур, к цефепиму и амикацину – 28,6 %, так же все штаммы были устойчивы к цефтазидиму.

Самостоятельный интерес представлял сравнительный анализ антибиограмм штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из ОРИТ различных ЛПУ. Несмотря на стандартизованные схемы при лечении синегнойной инфекции в таких отделениях, профили устойчивости к основным антисинегнойным антибиотикам в ОРИТ разных стационаров имели определенные различия. Максимальной устойчивостью к взятому спектру препаратов характеризовались культуры, изолированные в ОРИТ ККБ (рис. 1). Отчасти это можно объяснить поступлением в краевую больницу пациентов после длительного и безуспешного лечения, в том числе различными антибактериальными препаратами в территориальных ЛПУ. К тому же все эти культуры были изолированы практически одновременно в момент вспышки синегнойной инфекции. В ОРИТ специализированного кардиологического стационара доля устойчивых штаммов к основным антисинегнойным препаратам, за исключением резистентности к цефепиму (33,3 %), составила более 90 %. Относительно низкая устойчивость изолятов из кардиореанимации к цефепиму, очевидно, связана с минимальным его использованием в этом отделении. Наконец, в отделении реанимации многопрофильной городской больницы доля резистентных культур была наименьшей. Скорее всего, это

можно объяснить вариабельностью госпитализируемого в ОРИТ контингента больных по тяжести состояния, длительности пребывания и характеру выполняемых инвазивных манипуляций. Как следует из результатов локального мониторинга антибиотикорезистентности, препаратом выбора с наибольшей активностью для лечения синегнойной инфекции может быть цефтазидим (ОРИТ ГКБ) или цефепим (ОРИТ ИС).

Что касается проявления выделенными культурами других биологических свойств, были установлены следующие особенности. Подавляющее большинство штаммов (более 80 %) всех ЛПУ образовывало пигмент и проявляло гемолитическую активность, тогда как выраженность фосфолипазной активности и способность к пленкообразованию варьировали (рис. 2).

Показано, что штаммы *P. aeruginosa*, выделенные из ОРИТ всех ЛПУ, чаще проявляли пленкообразующую активность: ГКБ – 87,5 %, ККБ и ИС – 100 % культур. Также образовывали пленки все штаммы, выделенные в ОССХ. В ЭХО был отмечен самый низкий процент пленкообразующих культур (50 %), большинство из которых отнесены к группе «склонные к адгезии». Количество штаммов, положительных по данному признаку, нарастало в ряду ЭХО → РО ИС → ТХО → ОРИТ ГКБ → ОССХ, ОРИТ ИС, ОРИТ ККБ. Это связано с тем, что у *P. aeruginosa* способность к неспецифической адгезии на имплантируемых устройствах сочетается с механизмами специфическими – некоторые белки плазмы крови комплиментарны адгезинам синегнойной палочки. Адгезия возрастает при нарушениях мукоцилиарного транспорта, развивающегося у подавляющего большинства пациентов ОРИТ, в послеоперационном и посттравматическом

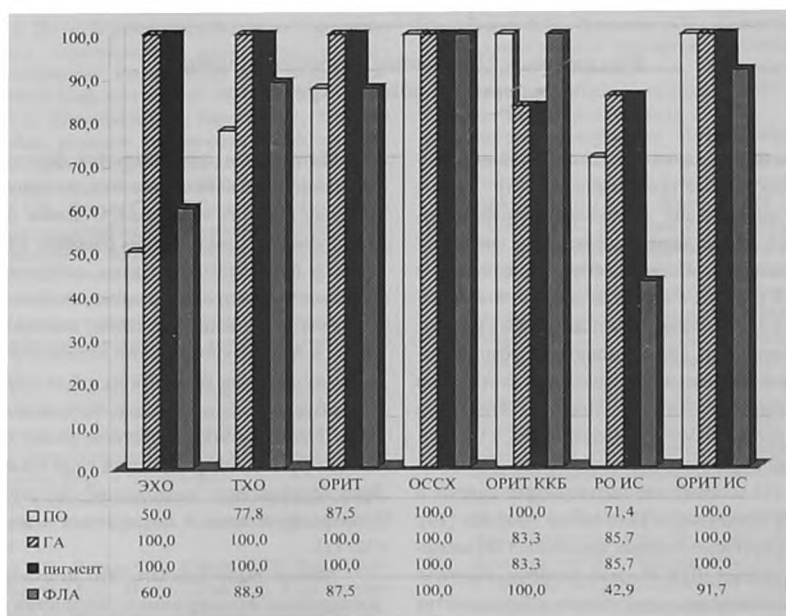


Рисунок 2. Факторы патогенности, обнаруженные у штаммов синегнойной палочки, циркулирующих в различных ЛПУ.

Таблица 1. Распределение культур *P. aeruginosa*, изолированных в различных ЛПУ

ЛПУ	Отделение	Число штаммов
Городская клиническая больница (ГКБ)	экстренной хирургии (ЭХО)	20
	торакальное хирургическое (ТХО)	18
	острой сердечно-сосудистой хирургии (ОССХ)	4
	реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ)	16
Краевая клиническая больница (ККБ)	ОРИТ	6
Институт сердца (ИС)	реабилитационное (РО)	12
	ОРИТ	7
Всего		83

Таблица 2. Доля (в %) устойчивых к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa*, выделенных в различных отделениях многопрофильного ЛПУ

Антибиотик	Отделение			
	ЭХО	ТХО	ОРИТ	ОССХ
Цефтазидим	80,0	55,6	62,5	100,0
Цефепим	60,0	88,9	87,5	100,0
Импипенем	60,0	100,0	87,5	100,0
Гентамицин	66,7	100,0	100,0	100,0
Амикацин	60,0	33,3	75,0	100,0
Ципрофлоксацин	50,0	88,9	87,5	100,0

Таблица 3. Встречаемость изучаемых признаков среди штаммов *P. aeruginosa*, изолированных из различных источников (%)

Материал	Признак			
	ГА	ПО*	ФЛА	Эскулин
Раневое отделяемое (35)	94,3	71,4	71,4	20
Мокрота, бронхиальный лаваж (25)	100	100	92	60
Содержимое кишечника (23)	100	65,2	78,3	39,1

*Примечание. *Включены пленкообразующие и склонные к адгезии культуры*

периодах, при острой сердечной и дыхательной недостаточности и во всех случаях проведения ИВЛ [4].

Культуры, обладающие выраженной фосфолипазной активностью, также чаще выделялись в специализированных отделениях. По-видимому, их закрепление в ОРИТ и ОССХ связаны с большим количеством инвазивных процедур с использованием пластиковых материалов (при катетеризации, дренировании, интубации трахеи и применении аппаратов искусственной вентиляции легких, содержащих детали из полимеров). Индукции этих признаков способствует и сурфактант [12, 13].

Доля эскулинпозитивных культур *P. aeruginosa* составила 37,3 % (31 штамм), что подтверждает данные о их циркуляции в стационарах различного профиля [14]. Большая часть эскулинпозитивных вариантов (19) изолирована в ОРИТ разных ЛПУ. Именно штаммы, гидролизующие эскулин, оказались устойчивыми к большинству антибиотиков, включая карбапенемы и амикацин, продуцировали фосфолипазу и практически все были склонны к пленкообразованию.

Интересным представляется фенотипическое разнообразие синегнойной палочки, изолируемой из разного биологического материала. В нашем исследовании *P. aeruginosa* была выделена из раневого отделяемого, мокроты и бронхиального лаважа, содержимого кишечника. Чаще всего изучаемые признаки были обнаружены у штаммов синегнойной палочки, изолированной из мокроты и трахеобронхиального отделяемого (табл. 3). Все штаммы обладали гемолитической активностью и пленкообразующей способностью, 92 % штаммов проявляли ФЛА. Благодаря этим свойствам, микроорганизмам удается разрушать поверхностный слой альвеолярных мембран (сурфактант), содержащий значительное количество фосфолипидов и закрепляться в зоне колонизации [12, 13].

Можно было ожидать, что штаммы *P. aeruginosa*, изолируемые из содержимого кишечника и менее других испытывающие прямое селективное воздействие каких-либо факторов, благодаря однотипным условиям их перистиривания в желудочно-кишечном тракте, будут про-

являть минимальную активность в реализации патогенного потенциала. Несмотря на это, гемолитическая и фосфолипазная активности экспрессировались у большого количества штаммов (23 и 18, соответственно). По-видимому, большинство изолятов, колонизирующих кишечник, имели «легочное» происхождение и сохраняли способность синтезировать факторы патогенности.

Культуры, изолированные из раневого отделяемого (в основном от больных ЭХО), хотя и проявляли высокую гемолитическую активность, не обладали выраженной склонностью к пленкообразованию (более 50 % были склонны к адгезии) и гидролизу эскулина, были менее устойчивы к антибактериальным препаратам.

Необходимо подчеркнуть, что выраженность изучаемых признаков, включая пигментообразование, снижалась после нескольких пассажей на искусственных питательных средах, что приводило к утрате специфичности фенотипов.

Заключение

Известно, что набор факторов вирулентности условно патогенных бактерий вариабелен и мало специфичен [14]. Полученные нами результаты свидетельствуют о значительной фенотипической гетерогенности популяций синегнойной палочки в различных хирургических стационарах. В определенной степени популяционно разнообразие обуславливается особенностями биотопа, послужившего источником инфицированного материала, и специфическими условиями конкретного стационара: в экстренной хирургии – раневое отделяемое, в ТХО, ОРИТ – мо-

крота и т. д. Установлено, что штаммы, изолированные из ОРИТ всех ЛПУ, характеризуются наиболее широким набором экспрессируемых факторов патогенности и выраженной множественной лекарственной устойчивостью. С одной стороны, в этом проявляется определенное противоречие, так как защитные реакции организма у пациентов этих отделений в большинстве случаев снижены и микроорганизмам нет необходимости проявлять патогенный потенциал в полной мере. С другой стороны, условия и средства оказания помощи, контингенты больных именно в отделениях реанимации становятся мощным провоцирующим и селективным фактором, способствующим изменению свойств бактерий. Характерная выраженность факторов патогенности и устойчивости к антибактериальным препаратам наблюдается и в отделениях с близким ОРИТ «статусом». Однако, в связи с высокой частотой встречаемости сходных по свойствам вариантов в других отделениях, возникает вопрос, не становятся ли госпитализированные в ОРИТ пациенты причиной распространения высоковирулентных штаммов при переводе их в другие отделения? Фенотипические характеристики *P. aeruginosa*, проявление которых в значительной степени индуцибельно, не позволяют дать однозначный ответ, поскольку не ясно, обусловлены ли они модификационной изменчивостью на уровне популяции, или их изменения закреплены генетически. ■

Авторы выражают благодарность Главному бактериологу г. Перми Н.С. Авдеевой и врачу-бактериологу Г.Б. О.Е. Ямликхановой за оказанное содействие и участие в работе.

Литература:

1. Зубков М.Н. Неферментирующие бактерии: классификация, общая характеристика, роль в патологии человека. Идентификация *Pseudomonas* spp. и сходных микроорганизмов. Инф. антимикроб. тер. 2003; 5 (1): 1-16.
2. Ермолов А.С., Меньшиков Д.Д., Карасев Н.А., Курилин Б.Л. Микробная этиология гнойно-септических осложнений в различных хирургических подразделениях стационара. Стерил. госпит. инфек. 2007; 2 (4): 39-43.
3. Сидоренко С.В., Резван С.П., Стерхова Г.А., Груднигина С.А. Госпитальные инфекции, вызванные *P. aeruginosa*. Распространение и клиническое значение антибиотикорезистентности. Антиб. химиотер. 1999; 3: 25-34.
4. Руднов В.А. Современное клиническое значение синегнойной инфекции и возможности ее терапии у пациентов отделений реанимации. Инф. антимикроб. тер. 2002; 4 (6): 170-7.
5. Шагин И.А., Чернуха М.Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2005; 7 (3): 271-85.
6. Руднов В.А. Антибиотикотерапия госпитальных инфекций вызванных *P. aeruginosa*. Рос. мед. журнал. 2005; 13 (7): 485-90.
7. Сидоренко С.В., Резван С.П., Еремина С.В., Поликарпова С.В., Карабак В.И., Меньшикова Е.Д., и др. Этиология тяжелых госпитальных инфекций в отделениях реанимации и антибиотикорезистентность среди их возбудителей. Антиб. химиотер. 2005; 50 (2-3): 33-41.
8. Васина Т.А., Свирица Л.М., Белопольский А.А., Шабанов А.К., Дроздова Н.Е., Евдокимова Н.В. Гнойно-воспалительные осложнения у больных с сочетанной травмой в период лечения их в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Профилактика и лечение. 2008; 2 (8): 33-41.
9. Методические указания МУК 4.2.1890-04 "Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам" (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 4 марта 2004 г.). 158 с.
10. Шагин И.А., Данилина Г.А., Чернуха М.Ю., Алексеева Г.В., Питон А.Б. Формирование биопленок клиническими штаммами бактерий комплекса *Burkholderia cerasia* в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик. Журн. микробиол. 2007; 1: 3-9.
11. Решедько Г.К., Рюкова Е.Л., Фаращук А.Н., Страчунский Л.С. Неферментирующие грамотрицательные возбудители нозокомиальных инфекций в ОРИТ России: проблемы антибиотикорезистентности. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2006; 8 (3): 243-59.
12. Ершов А.П. Диагностика и лечение вентил-тор-ассоциированных пневмоний. Вест. хирургии им. И.И. Грекова. 2000; 159 (2): 111-5.
13. Chastre J., Fagon J.Y. Ventilator-associated pneumonia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2002; 165: 867-903.
14. Сиволодский Е.П. Чувствительность к антибиотикам и свойства эскулинпозитивного биовара *Pseudomonas aeruginosa*. Антиб. химиотер. 2000; 8: 17-20.
15. Миронов А.Ю. Основы клинической микробиологии и иммунологии // Под ред. академика РАМН А.А. Воробьева. – Москва, 1997. – 160 с.