УДК 617 - 082.4 - 022.369: 579.841.11] - 036.22

Т.И. Карпунина*, М.В. Кузнецова*,, Н.В. Николаева*, В.А. Демаков****

E-mail: mar@iegm.ru

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НОЗОКОМИАЛЬНОЙ СИНЕГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИИ В МНОГОПРОФИЛЬНОМ ХИРУРГИЧЕСКОМ СТАЦИОНАРЕ

* ГОУ ВПО «ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Росздрава», г. Пермь;
** Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

Внутрибольничные инфекции вообще и в частности, обусловленные Pseudomonas aeruginosa, на протяжении длительного времени остаются серьезной проблемой клинической медицины и микробиологии. В последнее время она привлекает внимание все большего числа эпидемиологов, что связано не только с обсуждением новых направлений в эпидемиологии, затрагивающих такие понятия, как «фитонозы», «донозологические формы» той или иной инфекции, и другие. Достаточно противоречивы мнения исследователей, касающиеся таких устоявшихся понятий, как резервуар, источник, пути и механизмы передачи, критерии госпитальности, когда речь заходит о возбудителях нозокомиальной синегнойной инфекции. Подобные разночтения возникают не только по поводу заболеваний, связанных с P. aeruginosa, но и с большинством других внутрибольничных инфекционных осложнений, в этиологии которых установлено участие условно патогенных микроорганизмов (УПМ). Как правило, внутрибольничные инфекции, вызванные УПМ, развиваются на фоне основного заболевания у иммунокомпромитированных пациентов. Зачастую гнойно-септические инфекции (ГСИ) регистрируют после оперативных вмешательств, инвазивных лечебных и диагностических процедур. В подобных случаях самостоятельный интерес представляет оценка принадлежности изолируемого штамма к внутрибольничному, а в случае заноса – мониторинг возможной трансформации внебольничных возбудителей в нозокомиальные. Как отмечают многие исследователи, особое место в развитии эпидпроцесса внутрибольничной инфекции в многопрофильном хирургическом стационаре отводится отделениям реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), характеризующимся чрезвычайно высоким риском возникновения ГСИ, превышающим таковой в других отделениях в 5-10 раз [1, 2, 3].

Ранее нами были показаны фенотипическая гетерогенность популяций P. aeruginosa в различных отделениях крупного хирургического стационара и определенное своеобразие фенотипов циркулирующих в них штаммов [4]. Однако в связи с высокой частотой встречаемости в различных отделениях сходных по свойствам вариантов закономерно возникал вопрос: не становятся ли госпитализированные в ОРИТ пациенты причиной распространения высоковирулентных штаммов при переводе их в другие отделения? Фенотипические характеристики изолируемых культур с учетом зависимости проявления определяемых свойств от внешних условий не позволяют дать однозначного ответа на поставленный вопрос.

В этой связи цель исследования – проанализировать роль и место ОРИТ в развитии нозокомиальной синегнойной инфекции в крупном хирургическом стационаре с применением молекулярно-генетических методов анализа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведен ретроспективный анализ историй болезни 58 пациентов, находившихся на лечении в многопрофильном хирургическом стационаре в период январь–апрель 2009 г., инфицированных P. aeruginosa. Исследовано 58 штаммов, выделенных, в том числе, из отделения экстренной хирургии (ЭХО) – 20, торакального хирургического отделения (ТХО) – 18, отделения острой сердечно-сосудистой хирургии (ОССХ) – 4 и отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) – 16. Источниками выделения P. aeruginosa в большинстве случаев были раневое отделяемое, мокрота и бронхиальный лаваж, содержимое кишечника, то есть выделенные микроорганизмы могли быть как этиологическими агентами инфекции, так и представителями транзиторной микрофлоры. Штаммы, выделенные повторно от од-

ного больного, из проводимого анализа исключались. Оценка ингибирования роста бактерий антибактериальными препаратами осуществлялась диско-диффузионным методом в соответствии с МУК 4.2.1890-04. Образование биопленок изучали на поверхности 96-луночного полистиролового планшета согласно И.А. Шагиняну [5]. Гемолитическую активность (ГА) оценивали на кровяном агаре по величине зоны просветления вокруг колоний исследуемых штаммов. Фосфолипазную активность (ФА) изучали на желточном агаре. Генетическое типирование штаммов осуществляли посредством полимеразной цепной реакции (DAF-ПЦР), как описано J. Versalovic et al. [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что на определенном этапе стационарного лечения 38 (65,52%) человек из 58 госпитализированных и инфицированных P. aeruginosa являлись пациентами ОРИТ. В 6 случаях P. aeruginosa была выделена от больных до пребывания в ОРИТ, в 16 – после перевода в профилированное отделение, от остальных 16 человек – во время их лечения в ОРИТ.

Из 58 изученных культур 50 (86,2%) были полирезистентными. Из оставшихся 8 изолятов 6 штаммов были выделены до поступления больных в ОРИТ (4 резистентны к цефтазидиму и цефепиму, 2 – только к цефтазидиму), и 2 выделены от пациентов, не проходивших лечение в ОРИТ (чувствительны ко всем исследованным антибиотикам). Чувствительные штаммы P. aeruginosa выделяли от больных в ранние сроки госпитализации (до 4 суток).

На основании антибиотикограмм штаммов P. aeruginosa выявлены наиболее распространенные антибиотикофенотипы (табл. 1).

Все культуры образовывали пигмент и обладали гемолитической активностью, пленкообразование и фосфолипазная активность отмечены у 72,4% и 79,3%, соответственно. Чаще всего совокупность всех изучаемых признаков была обнаружена у штаммов синегнойной палочки, изолированных из мокроты и трахеобронхиального отделяемого. Учитывая, что подавляющее большинство штаммов образовывало пигмент и проявляло гемолитическую активность, тогда как выраженность фосфолипазной активности и способность к пленкообразованию варьировали, именно последние два признака были выбраны для популяционной характеристики штаммов (табл. 2).

Штаммы с полным набором свойств были изолированы во всех отделениях, но наибольшее их число было получено из ОРИТ. На основании фенотипических характеристик можно предположить, что в отделениях многопрофильного стационара циркулирует один (16 изолятов) ведущий штамм P. aeruginosa, для которого характерна устойчивость ко всем исследованным антисинегнойным антибиотикам, способность к пленкообразованию и продукция фосфолипазы. Штаммы, лишенные пленкообразующей способности и/или фосфолипазной активности, возможно, возникали в результате фенотипической дивергенции либо трансформации модального штамма и являются близкородственными.

Таблица 1

Наиболее распространенные фенотипы изученных штаммов P. aeruginosa

Антибиотикофенотип	Число штаммов	%
Цефтазидим+цефепим+имипенем +гентамицин+амикацин +ципрофлоксацин (фенотип А)	22	37,93
Цефтазидим+цефепим+имипенем +гентамицин+ципрофлоксацин (фенотип В)	4	6,90
Цефепим+имипенем+гентамицин+ ципрофлоксацин (фенотип С)	10	17,24
Цефтазидим+цефепим (фенотип D)	4	6,90
Другие фенотипы (встречаются не более чем у 3 штаммов)	16	27,58
Чувствительные штаммы	2	3,45

Таблица 2

Встречаемость сочетания высокой степени антибиотикорезистентности и изучаемых факторов патогенности среди штаммов P. aeruginosa

Сочетание признаков	Отделение				Число штаммов (%)
	ЭХО	ТХО	ОРИТ	ОССХ	
Фенотип А + ФА + ПО	4	2	8	2	16 (27,6%)
Фенотип А + ПО	2	2	–	–	4 (6,9%)
Фенотип С + ФА + ПО	–	3	2	–	5 (8,62%)

До последнего времени не сложилось единого мнения о преобладании экзо- либо эндогенного происхождения синегнойной инфекции в ОРИТ. Ряд исследователей пришли к заключению, что по мере нахождения пациентов в ОРИТ важную роль приобретает экзогенное инфицирование больных P. aeruginosa (до 50% случаев) [2, 7, 8]. Однако точно установить сроки, в течение которых происходит колонизация нестерильных локусов пациента госпитальной микрофлорой, достаточно сложно, так как это определяется многими факторами [9].

Для выявления эпидемиологических связей проведен ретроспективный анализ историй болезней пациентов, в материале которых были обнаружены штаммы P. aeruginosa с ведущим фенотипом. Оказа-

лось, что все они были изолированы от больных, проходивших лечение в ОРИТ: в 10 случаях – во время их пребывания в отделении, в 2 – через сутки после перевода в профильное отделение и в 4 отмечена поздняя манифестация ГСИ (9, 11, дважды 12 дней, соответственно). Период пребывания в ОРИТ составлял от 1 до 4 дней, а время от перевода в хирургические отделения из ОРИТ до выделения возбудителя варьировало от 1 до 12 (!) дней. Впервые штамм с такими свойствами был изолирован из содержимого кишечника больного М. 30.01.09 в ТХО, откуда в связи с ухудшением состояния он был переведен в ОРИТ. На протяжении всего периода исследования штаммы с подобным фенотипом периодически выделяли от пациентов всех отделений, в то время как из ОРИТ – с заметным постоянством. Учитывая полирезистентность и большой набор факторов патогенности у выделенного варианта, продолжительность его персистирования в ОРИТ (3 месяца), можно говорить о том, что именно в этом отделении складываются наиболее благоприятные условия для селекции и закрепления штаммов, отличающихся высоким патогенным потенциалом. По-видимому, изоляты из ЭХО, ТХО и ОССХ со схожими свойствами также имеют «реанимационное» происхождение. Принимая во внимание, что доля пациентов, проходящих через ОРИТ, во всех отделениях достаточно высока (табл. 3), можно полагать, что колонизация/инфицирование пациентов внутрибольничными штаммами происходит именно в ОРИТ с последующим распространением по отделениям.

Нужно отметить, что в то же самое время в хирургических отделениях стационара, включая ОРИТ, были изолированы штаммы P. aeruginosa, фенотипы которых не совпадали с ведущим, причем временной интервал их циркуляции в отделениях не превышал 1 месяца. Так, штамм P. aeruginosa 1-6 антибиотикофенотипа С с пленкообразующей способностью и продуцирующий фосфолипазу впервые изолирован в ОРИТ 13.02.09, и в течение месяца идентичные культуры выделяли из материала пациентов ТХО (P. aeruginosa 1-8; 1-9; 1-12; 2-1). По-видимому, одновременно в многопрофильном стационаре могут циркулировать несколько штаммов, формируя «длинные» или «короткие» эпидемиологические цепочки. 9 штаммов имели собственные индивидуальные характеристики, причем 8 были выделены от пациентов, не подвергавшихся реанимационным мероприятиям.

Таблица 3

Динамика пребывания пациентов в многопрофильном хирургическом стационаре (данные за год)

Отделение	Число больных	Количество дней пребывания в отделении	Число пациентов, прошедших через ОРИТ	Количество дней пребывания в ОРИТ	Доля пациентов, прошедших через ОРИТ (%)
ОССХ	1165	14-16	250	1	21,5
ТХО	1276	14-16	172	1-6	13,5
ЭХО	1269	9-10	290	1-3	22,9

С учетом того факта, что в зависимости от условий внутрибольничной среды, характера биотопа/материала, иммунологической реактивности макроорганизма, один и тот же штамм в процессе циркуляции может по-разному проявлять свои свойства, и наоборот, разные штаммы могут иметь одинаковые профили резистентности, продуцировать одни и те же факторы патогенности, было проведено генотипирование выделенных культур (рис. 1). Молекулярно-генетическое исследование выявило, что большинство штаммов P. aeruginosa, изолированных в ОРИТ, представляют один геновариант (рис. 1, А). Идентичный генетический профиль был обнаружен у ряда культур, изолированных от пациентов других отделений: ЭХО – 6 (30%) штаммов, ТХО – 4 (22,2%) штамма, ОССХ – 2 штамма (все пациенты прошли лечение в ОРИТ). Установлено, что некоторые изоляты имели сходный DAF-профиль с основным («модальным») вариантом, но отличались на 1-2 генетических события и, по-видимому, являлись близкородственными. Наблюдалось некоторое несоответст-

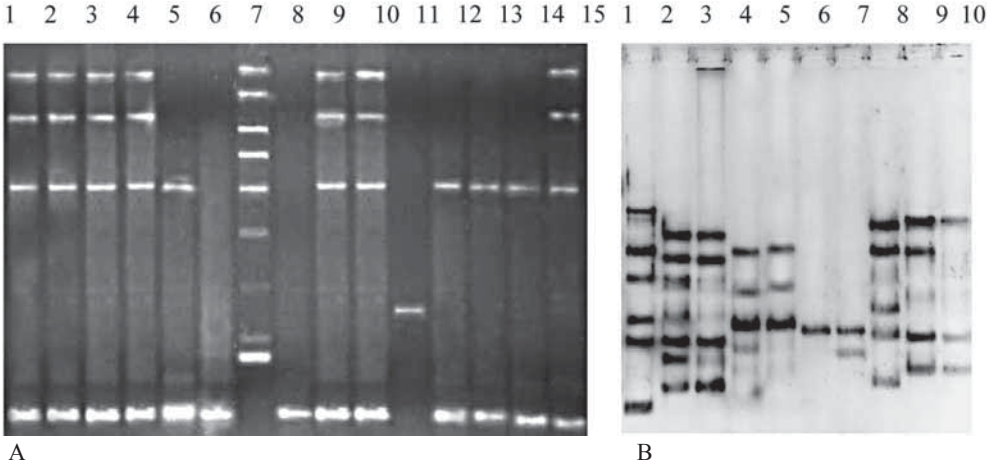

Рис. 1. Пример электрофоретического анализа продуктов DAF-ПЦР клинических изолятов P. aeruginosa. А: 1-15 – штаммы, изолированные в ОРИТ; В: 1-5 – штаммы, изолированные в ТХО; 6-10 – штаммы, изолированные в ЭХО

вие между данными фенотипического и генетического анализа: не все штаммы, принадлежащие к одному геновариванту, были фенотипически идентичны. При использовании только бактериологического метода эти культуры были нами приняты за разные.

Выявлено значительное количество геновариантов штаммов P. aeruginosa, не имеющих отношения к основному штамму. Наибольшее число таких культур обнаружено в ТХО – 7 и ЭХО – 6, причем среди них встречались идентичные изоляты (рис. 1, В). Гетерогенность DAF-профилей возбудителей, изолированных в этих отделениях, может свидетельствовать о внебольничном происхождении большинства штаммов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше предположение о циркуляции в многопрофильном ЛПУ госпитального штамма, сделанное на основе фенотипических характеристик культур, подтвердилось методом молекулярно-генетического анализа. Идентичные и/или схожие геноварианты штаммов P. aeruginosa были обнаружены во всех отделениях, причем на протяжении всего периода исследования. Полагаем, что ОРИТ явилось местом формирования и источником распространения госпитального штамма. Тот факт, что внебольничные варианты зачастую оказывались полирезистентными, свидетельствует о том, что традиционный маркер госпитальности – антибиотикоустойчивость не является основополагающим применительно к P. aeruginosa.

С учетом высокой гетерогенности популяций УПМ, в том числе и по признаку резистентности к антибактериальным препаратам, биологическим свойствам, использование молекулярно-генетических методов исследования для подтверждения госпитальной природы таких бактериальных культур может быть приоритетным. С помощью методов генотипирования штаммов, выделенных из разных экологических ниш и очагов инфекции, можно установить родство изолятов, подтвердить или исключить природу внутрибольничного заражения [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Решедько Г.К., Рябкова Е.Л., Кречикова О.И. и др. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров России // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2008. – Т. 10, №2. – С. 163-179.
2. Руднов В.А. Современное клиническое значение синегнойной инфекции и возможности ее терапии у пациентов отделений реанимации // Инф. и антимикроб. тер. – 2002. – Т. 4. – №6. – С. 170-177.
3. Сидоренко С.В., Резван С.П., Еремина С.В. и др. Этиология тяжелых госпитальных инфекций в отделениях реанимации и антибиотикорезистентность среди их возбудителей // Антиб. химиотер. – 2005. – Т. 50. – №2-3. – С. 33-41.
4. Кузнецова М.В., Николаева Н.В., Касатов А.В., Карпунина Т.И. Фенотипические характеристики штаммов Pseudomonas aeruginosa, изолированных в стационарах хирургического профиля // Уральский медицинский журнал. – 2009. – Т. 9.
5. Шагинян И.А., Данилина Г.А., Чернуха М.Ю. и др. Формирование биопленок клиническими штаммами бактерий комплекса Burkholderia cepacia в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик // Журн. микробиол. – 2007. – №1. – С. 3-9.
6. Versalovic J. Schneider M., De Bruijn F.J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequencebased polymerase chain reaction // Meth. Cell. Mol. Biol. – 1994. – V. 5. – P. 25-40.
7. Васина Т.А., Свирская Л.М., Белопольский А.А. и др. 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). – С. 33-41.
8. Bertrand X., Thouverez M., Talon D. et al. // Intensive Care Med. – 2001. – V. 27. – P. 1263-1268.
9. Яковлев С.В., Шахова Т.В., Рамишвили В.Ш. и др. Антибиотикорезистентность в стационаре: контролируем ли мы ситуацию? // Стерил. госпит. инфек. – 2007. 0Т. 2 (4). – С. 24-32.
10. Шагинян И.А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничной инфекции // Клинич. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2000. – Т. 2, №3. – С. 82-95.

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF NOSOCOMIAL PSEUDOMONAS-BASED INFECTION IN MULTI-TYPE SURGICAL HOSPITAL

T.I. Karpounina, M.V. Kouznetsova, N.V. Nikolayeva, V.A. Demakov

SUMMARY

The role and place of intensive care unit (ICU) in the progression of nosocomial Pseudomonas-based infection were analyzed using Pseudomonas aeruginosa 58 samples that were isolated in January-March, 2009 from different units of multi-type surgical hospital.It was found that 86,2% isolates appeared to be poly-resistant relatively to the selected range of the preparations with anti-pseudomonas activity.Combination of all the properties under study was demonstrated to be typical of the strains isolated from the intensive care unit. Molecular-genetic analysis revealed that the majority of those represented one P. aeruginosa genotype. We suggest that intensive care units appeared to be the area for the formation and the source for distribution of the nosocomial strain.

Key words: P. aeruginosa, nosocomial infection, ICU, gene typing.

Поступила в редакцию 12.09.2009 г.