

УДК 576.8.06:615.33

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ

В.Б. Туркутюков

Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: генетика, микроорганизмы, резистентность к антибиотикам.

Лекция, посвященная антибиотикорезистентности штаммов *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus pneumoniae* и *Mycobacterium tuberculosis*. На материале исследований, проведенных сотрудниками кафедры эпидемиологии ВГМУ в различных лечебно-профилактических учреждениях региона с применением генетических методов идентификации, показан рост числа инфекций, вызываемых резистентными к антибиотикам микроорганизмами. Главным фактором повышения количества антибиотикоустойчивых штаммов является повышение частоты применения антимикробных препаратов, и в первую очередь – антибиотиков широкого спектра действия. Подчеркивается необходимость территориального мониторинга резистентности и доведения его результатов до врачей различных специальностей.

Частота инфекций, вызываемых резистентными к антибиотикам микроорганизмами, растет во всем мире. Это ведет к увеличению расходов на здравоохранение, повышению заболеваемости и смертности. Существует множество причин, объясняющих эту тенденцию, однако главным фактором увеличения количества антибиотикоустойчивых бактерий является повышение частоты применения антимикробных препаратов, и в особенности антибиотиков широкого спектра действия. Лечение инфекций в настоящее время становится все менее эффективным, поскольку постоянно увеличивается количество и распространенность пенициллин-резистентных штаммов и быстро растет устойчивость микроорганизмов к другим антибиотикам, включая макролиды, цефалоспорины, и прочим современным группам антибактериальных химиопрепаратов [2, 6].

Важной причиной, способствующей возникновению и распространению внутрибольничных инфекций, является формирование госпитальных штаммов микроорганизмов, обладающих устойчивостью к антибиотикам. Их возникновение обусловлено селективным давлением антимикробных препаратов на популяцию бактерий, а также передачей плазмид и мигрирующих генетических элементов, которая может осуществляться между клетками бактерий, относящихся к разным видам, родам и даже семействам. Это обеспечивает высокие темпы эволюции биологических свойств, прежде всего устойчивости к антимикробным препаратам, формирование и распространение в стационарах госпитальных штаммов, обладающих механизмами адаптации к абиотическим и живым объектам больничной среды [6]. Актуальность проблемы послужила основанием для

проведения на кафедре эпидемиологии ВГМУ комплексного молекулярно-генетического мониторинга формирования и циркуляции штаммов возбудителей инфекционных заболеваний.

Антибиотикочувствительность *Staphylococcus aureus*

С целью изучения эпидемиологии инфекций, вызванных *S. aureus*, Т.В. Баранович был проведен анализ молекулярно-генетических характеристик и антибиотикочувствительности 63 штаммов *S. aureus*, выделенных в стационарах и от пациентов с внебольничными стафилококковыми инфекциями. Среди изолятов 30 штаммов (48 %) оказались метициллинорезистентными. Штаммы *S. aureus*, выделенные в стационарах, составили здесь подавляющую долю: 28 из 30 изолятов (93 %). Большинство изолятов метициллинрезистентных стафилококков (90 %) были представлены одним клоном – ST 239, SCCmec III, PVL(-), с двумя родственными типами стафилококкового протеина А (spa типы 3 и 351). Этот клон отличается множественной резистентностью к антибиотикам. 41 % штаммов *S. aureus* был устойчив к рифампицину. Два внебольничных изолята метициллинрезистентных стафилококков оказались генетически разнородными: один был охарактеризован как ST 30, SCCmec IV, spa тип 19, PVL(+), другой – как ST 8, SCCmec IV, с новым типом spa 826, PVL(-). Среди метициллиночувствительных изолятов *S. aureus* было выявлено 8 различных генетических подтипов, из которых 55 % продуцировали PVL. Один клон, который был охарактеризован как ST 121, spa тип 273, PVL(+), был причиной фатальной внебольничной пневмонии.

Таким образом, штаммы *S. aureus*, преимущественно выделяемые в российских стационарах, принадлежат к множественно-резистентному бразильско-венгерскому клону метициллинрезистентных стафилококков ST 239, однако этот клон имеет измененный профиль антибиотикорезистентности. Кроме того, обнаружено появление изолятов PVL(+), метициллинчувствительных, с повышенной вирулентностью, что требует продолжения эпидемиологического надзора за состоянием проблемы стафилококковых инфекций в регионе [9, 10].

Антибиотикочувствительность *Pseudomonas aeruginosa*

В последнее время, несмотря на определенный прогресс в антибактериальной терапии тяжелых госпитальных инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, частота неудач здесь остается крайне высокой, что

Туркутюков Вячеслав Борисович – заведующий кафедрой эпидемиологии и военной эпидемиологии ВГМУ; тел.: 8 (4232) 44-63-53; e-mail: kaf.epi.vladmed@mail.ru

свидетельствует о невозможности разработки универсальных рекомендаций по эмпирической терапии инфекций, вызванных этим микроорганизмом, не учитывающих данных локального мониторинга антибиотикорезистентности. С целью оценки чувствительности к антибактериальным химиопрепаратам Э.В. Слабенко было проведено исследование наличия генетически обусловленной резистентности у штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с внутрибольничной пневмонией в отделениях реанимации и интенсивной терапии [5].

Так, у 20,3% штаммов был выявлен ген *imp*, кодирующий механизм резистентности к имипенему. Ген *ampA*, обуславливающий резистентность к аминогликозидам, выявлен у 91% штаммов. Несколько выше оказалось и число штаммов *P. aeruginosa*, у которых мутированы гены *gyrA* и *gyrB*, кодирующие ДНК-гиразу – фермент, являющийся первичной мишенью для большинства хинолонов. Модификации этих генов, выявленные в ходе работы, обеспечивают механизмы резистентности к хинолонам у исследованных штаммов. Наличие таких мутаций в генах ДНК-гиразы приводит к повышению минимально подавляющей концентрации антибиотика в 4–8 раз, что обосновывает необходимость коррекции с целью повышения эффективности антимикробной химиотерапии [4].

Процессы формирования и циркуляции антибиотикорезистентных штаммов *P. aeruginosa* в многопрофильных стационарах имеют некоторые различия (рис. 1). Однако среди них выявлено значительное число штаммов, имеющих мутации генов, кодирующих ДНК-гиразу, свидетельствующее об интенсивных процессах формирования резистентности к хинолонам [5].

Необходимо отметить, что различия в интенсивности процессов эволюции у штаммов *P. aeruginosa* связаны с различиями в политике применения антибиотиков в стационарах, что еще раз доказывает необходимость локального мониторинга формирования и циркуляции штаммов, резистентных к антибактериальным химиопрепаратам.

Антибиотикочувствительность *Staphylococcus pneumoniae*

Пациенты противотуберкулезных стационаров и медицинский персонал составляют группы риска по пневмококковым инфекциям дыхательных путей, что связано с действием на организм туберкулезной инфекции и длительным нахождением в закрытом коллективе в процессе лечения. С целью оценки достоверности данных, полученных микробиологическими методами, было проведено молекулярно-генетическое исследование, позволяющее с высокой точностью определить наличие генов, отвечающих за устойчивость штаммов *S. pneumoniae* к определенным группам антибиотиков, часто применяемых в противотуберкулезном диспансере – фторхинолонам, макролидам и рифампицину. Рост резистентности микроорганизмов, в том числе и пневмококков, к

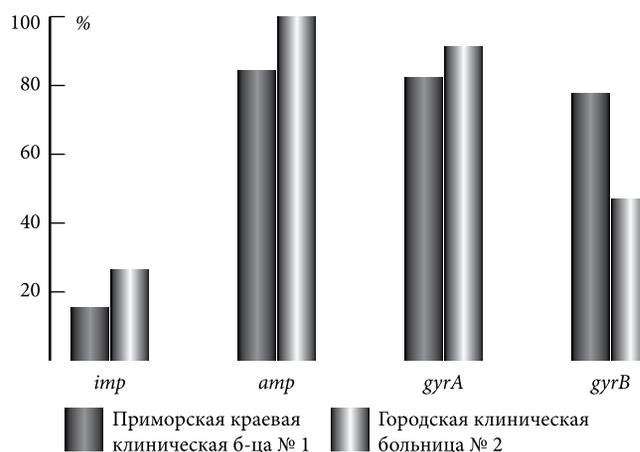


Рис. 1. Частота выявления генов резистентности к антибиотикам у штаммов *P. aeruginosa*, возбудителей внутрибольничных инфекций, в ОРИТ многопрофильных стационаров:

гены резистентности: *imp* – к имипенему; *ampA* – к ампициллину; *gyrA* и *gyrB* – к хинолонам.

антибиотикам является глобальной проблемой для системы общественного здравоохранения. Особое значение рост резистентности имеет для педиатрии в связи с частым использованием антибиотиков для лечения обычных детских инфекционных заболеваний в амбулаторных условиях и тяжелых инфекций в стационарах [6].

В работе, проведенной Ю.Е. Скурихиной, у 21,9% штаммов *S. pneumoniae*, выделенных у детей, больных туберкулезом, был выявлен ген *mefE*. Ген *ermB* присутствовал в 36,6% случаев. Таким образом, до 58,5% штаммов пневмококка оказались резистентны к макролидам. Среди штаммов от контрольной группы 20% имели ген *mefE* и 10% – ген *ermB*, т.е. устойчивость к макролидам продемонстрировали до 30% штаммов.

Мишенью действия хинолонов являются бактериальные топоизомеразы – топоизомераза IV и ДНК-гираза. ДНК-гираза состоит из двух субъединиц *gyrA* и двух субъединиц *gyrB* (гены *gyrA* и *gyrB*), топоизомераза IV – из субъединиц *parC* и *parE* (гены *parC* и *parE*). У *S. pneumoniae* первичной мишенью действия для большинства хинолонов является топоизомераза IV. В связи с наличием у этих препаратов двух мишеней действия устойчивость к ним формируется ступенеобразно. После возникновения и селекции мутаций в генах фермента, являющегося первичной мишенью, антибактериальный эффект проявляется за счет подавления активности второго фермента – вторичной мишени. Если воздействие хинолонов на микроорганизм продолжается, то возможно возникновение и селекция мутаций во вторичной мишени и дальнейшее повышение минимально подавляющей концентрации антибиотика [3]. В ходе исследования выявлены модификации генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* соответственно в 68,4, 52,1, 68,7 и 44,2% наблюдений, то есть изучаемые штаммы *S. pneumoniae* имели разную степень устойчивости к фторхинолонам.

Рифампицин является основным противотуберкулезным антибиотиком. Резистентность пневмококка

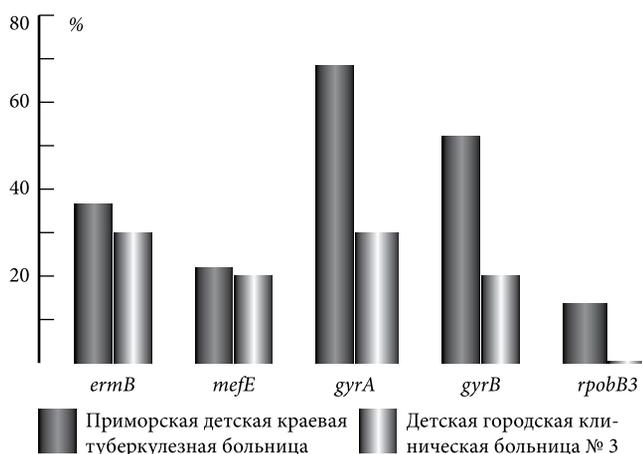


Рис. 2. Уровни устойчивости к антибиотикам у штаммов *S. pneumoniae*, выделенных у разных групп пациентов:

гены: *ermB*, *mefE* – устойчивости к макролидам, *gyrA*, *gyrB* – гираза (хилоны), *rpoB3* – β -субъединица РНК-полимеразы (рифампицин).

к нему возникает в результате мутаций, происходящих в гене *rpoB*. Мутации в области *rpoB3* обнаружены у 3 штаммов *S. pneumoniae* (13,6%), выделенных у детей, больных туберкулезом.

Таким образом, можно сделать вывод о формировании резистентности штаммов *S. pneumoniae* к различным современным антибактериальным препаратам широкого спектра действия, таким как макролиды, фторхинолоны и рифампицин. Также показаны различия уровней резистентности между штаммами, полученными от детей, больных туберкулезом, и от детей контрольной группы (рис. 2).

Такие различия можно объяснить несколькими факторами. Во-первых, дети, болеющие туберкулезом, имеют низкий уровень иммунитета и продолжительное время (иногда до 12 месяцев) находятся в закрытом коллективе. Во-вторых, они длительными курсами получают антибиотики широкого спектра действия как для лечения туберкулеза (рифампицин), так и для лечения сопутствующих инфекционных заболеваний (макролиды, фторхинолоны) [6, 7].

Присутствие различий в антибиотикорезистентности говорит о формировании специфических внутрибольничных штаммов *S. pneumoniae* в противотуберкулезном диспансере, которые имеют высокий уровень устойчивости к антибиотикам и могут представлять значительную опасность при возникновении заболевания, особенно у детей с тяжелым хроническим страданием и низким уровнем иммунитета.

Антибиотикочувствительность *Mycobacterium tuberculosis*

Молекулярно-эпидемиологическое исследование 86 клинических изолятов *M. tuberculosis*, проведенное О.В. Говор, выявило факт преобладания на территории Приморского края штаммов семейства Бейджинг, VNTR-типа 42425, которые составили 41,8% исследованных культур. У 51 штамма *M. tuberculosis* выявлен ген резистентности к изониазиду (*katG315*), у 30 – к рифампицину (*rpoB531*). Среди исследованных культур 27 (32,1%) оказались полирезистентными, и

51,9% из них имели генотип Beijing, VNTR-тип 42425. Полирезистентные варианты данного семейства сохраняют высокую патогенность и трансмиссивность. Дальнейшее распространение таких вариантов *M. tuberculosis* угрожает развитием неконтролируемого эпидемического процесса [1, 8].

Заключение

Современная медицина успешно использует достижения естественных наук, интенсивно применяет новые технологии для диагностики и лечения заболеваний. В последнее время к традиционным микробиологическим методам лабораторной диагностики инфекционных заболеваний добавились новые, основанные на использовании молекулярно-генетических технологий. Универсальность, высокая чувствительность и относительная простота исполнения сделали их незаменимыми для решения различных задач клинической диагностики, как для прямого обнаружения и идентификации возбудителей, так и для изучения их чувствительности к антибактериальным химиопрепаратам. Применение генетических методов обосновано тем, что фенотипические методы здесь не всегда эффективны. Это обусловлено тем, что у микроорганизмов при культивировании *in vitro* снижается экспрессия генов, что приводит к снижению фенотипического признака или даже его отсутствию. Использование же генетических методов идентификации бактерий и маркеров их устойчивости позволит более рационально назначать лечение, а также своевременно вносить коррективы в его стандарты. Неоспоримо значение территориального мониторинга резистентности и доведения его результатов до врачей различных специальностей. В каждом лечебно-профилактическом учреждении необходимо иметь локальные данные о резистентности микроорганизмов, и в первую очередь это относится к отделениям с высокой частотой применения антибактериальных химиопрепаратов.

Литература

1. Говор О.В., Филипенко М.Л., Туркутюков В.Б. и др. Особенности распространения штаммов *M. tuberculosis*, с лекарственной устойчивостью при туберкулезе легких в Приморском крае // Человек и лекарство: материалы II Дальневосточного регионального конгресса с международным участием. Владивосток: Медицина ДВ, 2004. С. 201–202.
2. Мартынова, А.В., Туркутюков В.Б. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг неинвазивных штаммов *S. pneumoniae* // Вестник новых медицинских технологий. 2007. Т. 14, № 2. С. 143.
3. Скурихина Ю.Е. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *S. pneumoniae*, выделенных у детей с туберкулезной инфекцией: дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2009. 248 с.
4. Слабенко, Э.В. Антибиотикорезистентность *Pseudomonas aeruginosa* // Естественное и гуманитарное: сб. науч. работ. Томск, 2005. Т. 2, № 1. С. 46.
5. Слабенко Э.В. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *P. aeruginosa*, возбудителей внутрибольничных пневмоний у пациентов с черепно-мозговыми травмами: дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2007. 248 с.

6. Туркутюков В.Б., Скурихина Ю.Е., Скурихина Л.А., Баян В.П. Молекулярно-генетический мониторинг за формированием резистентности к антибиотикам штаммов микроорганизмов, выделенных у пациентов специализированных стационаров // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2009. № 14. С. 46–50.
7. Туркутюков В.Б., Яковлев А.А., Дзюба Г.Т. и др. Изучение механизмов формирования актуальной инфекционной и неинфекционной заболеваемости в Дальневосточном регионе // Тихоокеанский мед. журн. 2008. № 3. С. 46–49.
8. Govor O. The trend in basic epidemiological indicators for tuberculosis in Primorye over the period 1992-2002 // JRL Research & Analytical Supplement, 2004. No. 21. P. 1810–1811.
9. Baranovich T., Zaraket H., Higuchi W. et al. C2-194 Molecular Characterization of Panton-Valentine Leukocidin-Positive Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in Russia // 47th ICAAC, Chicado, September 17-20. 2007. P. 113.
10. Baranovich T., Zaraket H., Shabana I.I. et al. Molecular characterization and susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals and the community in Vladivostok, Russia // Clin. Microbiol. Infect. 2009. Aug 4.10.1111/j. Pp.1469-0691.2009.02891-02898.

Поступила в редакцию 11.02.2010

MOLECULAR-GENETIC MONITORING OF MICROORGANISMS RESISTANCE TO ANTIBIOTICS

V.B. Turkutyukov

Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia)

Summary – The author presents a lecture devoted to antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus pneumoniae* and *Mycobacterium tuberculosis* strains. The examinations conducted by the VG MU Epidemiology Department staff in various regional medical and preventive treatment facilities via genetic methods of identification allowed authors to point out the growing number of infections caused by microorganisms being resistant to antibiotics. The leading factor proved to be responsible for the increase of antibiotic-resistant strains is increasing frequency of prescription of antimicrobial agents, first of all, broad-spectrum antibiotics. The authors highlight the need to territorially monitor the resistance and disclose the results among the doctors of various specialties.

Key words: genetics, microorganisms, antibiotic resistance.

Pacific Medical Journal, 2011, No. 2, p. 28–31.

УДК 616.2-008.9:616.153.915.39:616.61-008.64]-092.9

ВЫРАЖЕННОСТЬ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В РЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЕ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛЬЮ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Ю.С. Ландышев¹, Н.А. Щербань²

¹ Амурская государственная медицинская академия (675013 г. Благовещенск, ул. Горького, 95),

² Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова (197022 г. Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8)

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, респираторная система, хроническая почечная недостаточность, дигидрокверцетин.

На модели экспериментальной хронической почечной недостаточности изучено состояние процессов перекисного окисления липидов в респираторной системе крыс. Выявлена активация свободно-радикальных реакций в легочной ткани, превышающая сывороточные значения в несколько раз. Установлен значительный антиоксидантный эффект биофлавоноида дигидрокверцетина, выражающийся в ингибировании выработки продуктов первого этапа перекисного окисления липидов и повышении активности сывороточного церулоплазмينا.

Развитие диализных технологий позволило значительно увеличить продолжительность жизни больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН), однако это способствовало возникновению особых условий функционирования организма при длительной уремии [6]. Результатом этого явились многочисленные осложнения со стороны тех органов и систем, которые берут на себя часть выделительной функции почек. Одной из них является респираторная система, что и определяет необходимость ее исследования в условиях уремии [5].

Щербань Наталья Анатольевна – канд. мед. наук, ассистент кафедры пульмонологии СПбМУ; e-mail: scherbann@mail.ru

В ряде исследований было показано, что длительное течение ХПН приводит к фиброзу интерстициальной ткани легких, значительному снижению их диффузионной способности и гипоксемии, которая только у 20% пациентов поддается коррекции достижением целевого уровня гемоглобина [10, 11]. Формирование легочного фиброза при хронической почечной недостаточности было подтверждено в экспериментальных исследованиях [7]. Аналогичные изменения были обнаружены при электронно-микроскопическом исследовании ткани легких больных с длительной уреемией: визуализировались участки повреждения альвеолярно-капиллярной базальной мембраны, перикапиллярный отек и очаговый фиброз интерстиция [8].

Поражение респираторной системы при ХПН является следствием разнообразных причин, среди которых выделяют уремическую интоксикацию, нарушение водно-электролитного баланса и минерального обмена, развитие сопутствующей сердечной недостаточности, иммунологических нарушений [12]. Существует и ряд других механизмов, которые в настоящее время остаются недостаточно изученными.