

УДК: 616.24-002+616.9]-022.369:615.33:579.841.11

В.Б. Туркутюков, В.Б. Шуматов, Э.В. Слабенко,
Г.А. Смирнов, В.Н. Краснощеков, В.П. Борзов,
Л.М. Климова, Л.Н. Лебедева

МОНИТОРИНГ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ *Pseudomonas Aeruginosa* — ВОЗБУДИТЕЛЯ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ

Владивостокский государственный медицинский
университет,
Приморская противочумная станция (г. Уссурийск),
Городская клиническая больница № 2
(г. Владивосток),
Приморская краевая клиническая больница № 1
(г. Владивосток)

Ключевые слова: антибиотики, резистентность,
синегнойная инфекция.

Среди различных подгрупп больных наиболее высокая летальность (50–60%) регистрируется при бактериемиях, а при пневмониях, вызванных *Pseudomonas aeruginosa*, этот показатель доходит до 70%. Частота развития синегнойной инфекции во многом определяется нозологической структурой пациентов, тяжестью их исходного состояния, распространенностью инвазивных процедур и длительностью респираторной поддержки.

Клинически важной особенностью неферментирующих микроорганизмов является высокая частота их резистентности к различным классам антимикробных химиопрепаратов [5]. Сопоставленные данные о распространении антибиотикорезистентности среди штаммов *P. aeruginosa*, полученные в различных регионах, свидетельствует о ее значительной вариабельности. Так, в Бельгии частота устойчивости *P. aeruginosa* к пиперациллин/тазобактаму, цефтазидиму и цефепиму была на 20–30% ниже, а к имипенему — на 20% выше, чем в исследовании С.В. Сидоренко и др. [1]. Наиболее активными антибиотиками оказались амикацин, пиперациллин/тазобактам и цефепим [7]. Среди штаммов *P. aeruginosa*, выделенных в Северной Америке, частота устойчивости к карбапенемам была несколько ниже и составила 4,2% для меропенема и 12,5% для имипенема [6]. Такие выраженные колебания объясняются принципиальными различиями в политике применения антибиотиков. [1]. Следует иметь в виду, что длительное лечение тяжелых псевдомонадных инфекций антибиотиками разных групп может привести к формированию штаммов микроорганизма, устойчивых ко всем известным антипсевдомонадным препаратам [8].

В последнее время, несмотря на определенный прогресс в антибактериальной терапии тяжелых госпитальных инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, процент неудач остается крайне высоким. Имеющиеся

данные однозначно свидетельствуют о невозможности разработки универсальных рекомендаций по эмпирической терапии заболеваний, вызванных *P. aeruginosa*, не учитывающих данные локального мониторинга антибиотикорезистентности.

Целью данного исследования стал анализ формирования и особенностей циркуляции резистентных к антибактериальным химиопрепаратам штаммов *P. aeruginosa* — возбудителей внутрибольничных инфекций как важной составляющей в обеспечении эффективного инфекционного контроля за госпитальными инфекциями.

В работе были исследованы 66 штаммов *P. aeruginosa*, выделенные от больных, находившихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) Городской клинической больницы № 2 и Приморской краевой клинической больницы № 1, из которых 27 были возбудителями внутрибольничной пневмонии, 33 — возбудителями раневых инфекций и 6 выделены у носителей. Исследованию также были подвергнуты и 12 штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из объектов больничной среды этих же стационаров. Для реидентификации и получения изолированных колоний использовали селективную среду с цетримидом и налидиксиновой кислотой (Sanofi Pasteur) и среду *Pseudomonas Agar* (HiMedia).

ДНК *P. aeruginosa* получали методом экстракции фенол-хлороформом (1:1) [4]. Полимеразная цепная реакция проводилась по методике, описанной S. Finnan et al. (2004), включавшей следующие этапы: выделение ДНК, амплификацию, секвенирование и электрофоретическую детекцию результатов [3]. Каждый цикл амплификации выполняли при особых температурных режимах: денатурация ДНК — 92–94°C (1 мин), отжиг праймеров — 45–68°C (0,5–2 мин), синтез комплементарной цепи — 70–72°C (1–3 мин). Параметры и число циклов амплификации соответствовали протоколам и характеристикам праймеров. В работе исследована чувствительность штаммов к имипенему, аминогликозидам и фторхинолонам, для чего были использованы праймеры к генам резистентности *amrA* (5'-CAT-CAG-CGA-ACG-CGA-CTA-CAC-CGA-AGC-G-3'), *gyrA* (5'-AGT-CCT-ATC-TCG-ACT-ACG-CGA-T-3'), *gyrB* (5'-TGC-GGT-GGA-ACA-GGA-GAT-GGG-CAA-GTA-C-3'), *imp* (5'-GAA-GGG-GTT-TAT-GTT-CAT-AC-3') производства «СибЭнзим» (Россия).

При исследовании чувствительности к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от больных с различной нозокомиальной инфекционной патологией, дискодиффузионным методом был получен разнообразный фенотипический профиль культур (табл. 1).

Так, практически все группы антибиотиков, к которым оценивалась чувствительность, были неактивными по отношению к большинству исследованных штаммов. Исключение составил лишь имипенем, однако значительный рост числа штаммов с умеренной чувствительностью здесь свидетельствовал о процессах активного

Таблица 1

Резистентность к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa*, выделенных при нозокомиальных инфекциях (n=78)

Антибиотик	Кол-во штаммов, %		
	R	I	S
Гентамицин	62,5	37,5	—
Амикацин	53,1	37,5	9,4
Цефтазидим	43,8	43,8	12,4
Имипенем	20,0	60,0	20,0
Ципрофлоксацин	52,9	47,1	—

Примечание: R — устойчивые, I — умеренно чувствительные, S — чувствительные.

формирования резистентности. Такие штаммы микроорганизмов требуют увеличения дозы или кратности введения антибиотика, что не всегда возможно.

Сравнивая полученные данные с результатами проведенного в 1997–1999 гг. Л.С. Страчунским и др. многоцентрового исследования, необходимо отметить, что полученные нами данные о частоте резистентности микроорганизмов к гентамицину и имипенему были практически идентичными [2]. Однако чувствительные штаммы к ципрофлоксацину, цефтазидиму и к амикацину регистрировались реже.

С целью оценки достоверности полученных результатов было проведено исследование наличия генетически обусловленной резистентности *P. aeruginosa*. Так, у 20,3% штаммов был выявлен ген резистентности к имипенему (*imp*), что полностью соответствует полученной фенотипической картине чувствительности к данному антибиотику. Ген, обуславливающий резистентность к аминогликозидам (*ampA*), выявлен у 91% штаммов, что значительно превышало данные, полученные дискосиффузионным методом и свидетельствовало о почти трети ложноотрицательных результатов. Несколько выше оказалось и число штаммов *P. aeruginosa*, у которых мутированы гены (*gyrA*, *gyrB*), кодирующие ДНК-гиразу — фермент, являющийся первичной мишенью для большинства хинолонов. Модификации этих генов (86,1 и 64,6% соответственно), выявленные в ходе исследования, обеспечивают механизмы резистентности к фторхинолонам. 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.

Процессы формирования и циркуляции антибиотикорезистентных штаммов *P. aeruginosa* в ОРИТ многопрофильных стационаров имеют некоторые различия. Так, в краевой больнице число штаммов, резистентных к имипенему, было минимальным, однако среди них зарегистрировано значительное число имевших мутации генов, кодирующих ДНК-гиразу (рис.).

Среди культур, выделенных в городском стационаре, все были нечувствительными к аминоглико-

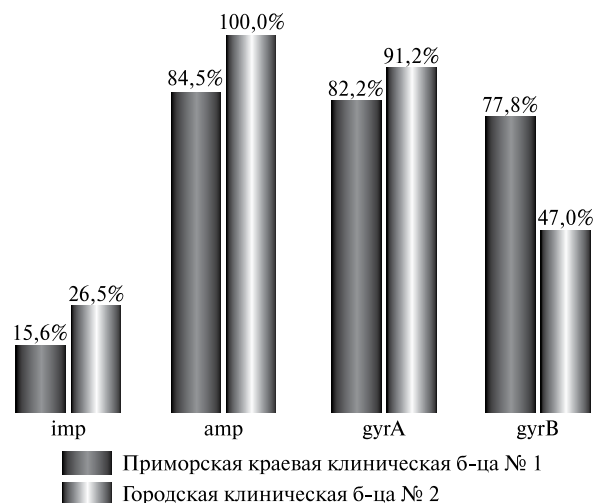


Рис. Частота выявления генов резистентности к антибиотикам у штаммов *P. aeruginosa* в ОРИТ многопрофильных стационаров.

зидам, и в 1,7 раза чаще, чем в краевой клинической больнице № 1, выявлялись штаммы, имевшие ген резистентности к имипенему. Частота обнаружения генов, обуславливающих резистентность к фторхинолонам, носила неравномерный характер: ген *gyrA* регистрировался практически в 2 раза чаще, чем *gyrB*, что свидетельствовало об интенсивных процессах формирования резистентности к хинолонам.

Определенный интерес представлял анализ распространения различных генотипов резистентности у штаммов, выделенных от пациентов с внутрибольничными пневмониями в ОРИТ многопрофильных стационаров. Здесь циркулировали различные резистентные клоны *P. aeruginosa*. Так, из материала от больных внутрибольничной пневмонией в Городской клинической больнице № 2 таких клонов было выявлено пять, а в краевой клинической больнице № 1 — три. Особое беспокойство вызывает выделение первого генотипа *P. aeruginosa*, имеющего в своем составе гены резистентности (*imp*, *ampA*, *gyrA*, *gyrB*), которые обеспечивают устойчивость ко всем изученным антибиотикам. Возможность эффективной терапии внутрибольничной пневмонии, вызванной такими штаммами, представляется сомнительной. Данный генотип обнаруживался в близких показателях в ОРИТ обоих стационаров.

2-й и 5-й генотипы *P. aeruginosa* были обнаружены только в ОРИТ городской больницы, однако частота выявления этих вариантов была различна — они, по-видимому, клонально разнородны. Штаммы микроорганизма с объектов больничной среды отделения относились к 1-му и 4-му генотипам.

Особенностью генотиповой характеристики микроорганизмов, выделенных от больных внутрибольничной пневмонией в ОРИТ краевой больницы было ее полное совпадение со спектром резистентности *P. aeruginosa*, выделенных с объектов внешней среды отделения (табл. 2). Это имеет важное эпидемиологическое значение, так как позволяет предположить

Таблица 2

Наиболее распространенные генотипы резистентности к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa* — возбудителей внутрибольничных пневмоний (n=27)

Генотип резистентности	Кол-во штаммов	
	абс.	%
Городская клиническая больница № 2		
1-й генотип	3	17,6
2-й генотип	—	—
3-й генотип	2	11,8
4-й генотип	5	29,4
5-й генотип	6	35,3
6-й генотип	1	5,9
Внешняя среда городской больницы		
1-й генотип	1	50,0
4-й генотип	1	50,0
Приморская краевая клиническая больница № 1		
1-й генотип	2	20,0
2-й генотип	—	—
3-й генотип	—	—
4-й генотип	7	70,0
5-й генотип	1	10,0
6-й генотип	—	—
Внешняя среда краевой больницы		
1-й генотип	4	40,0
4-й генотип	5	50,0
5-й генотип	1	10,0

Примечание: 1-й генотип — *imp*, *ampA*, *gyrA*, *gyrB*, 2-й генотип — *imp*, *ampA*, *gyrB*, 3-й генотип — *imp*, *ampA*, *gyrA*, 4-й генотип — *ampA*, *gyrA*, *gyrB*, 5-й генотип — *ampA*, *gyrA*, 6-й генотип — *ampA*.

участие этих штаммов в возникновении инфекционной патологии у пациентов отделения.

Разнообразие генотипов резистентности к антибактериальным препаратам было характерно и для штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от больных с раневыми инфекциями в области хирургического вмешательства, находившимися в ОРИТ стационаров. Так, в Городской клинической больнице № 2 доминировал 5-й вариант комплекса генов резистентности к антибиотикам (39,8%), несколько реже регистрировались 4-й (26,7%), 1-й (13,4%) и 6-й (6,7%) генотипы. В ОРИТ краевой клинической больницы № 1 значительно чаще выявлялся 4-й вариант, обнаруженный у 77,9% штаммов *P. aeruginosa*, реже — 1-й, 2-й и 5-й (11,1, 5,5 и 5,5% соответственно), но не встречались 3-й и 6-й генотипы резистентности.

Таким образом, в госпитальных условиях сформировались и циркулируют полирезистентные штаммы псевдомонад, что подтверждается и результатами изучения генотипов среди микроорганизмов, выделенных с объектов больничной среды. Штаммы *P. aeruginosa* — возбудители внутрибольничных инфекций, по набору генов резистентности к антипсевдомонадным антибиотикам отнесенные к 1-му и 4-му геновариантам, в обоих стационарах были госпитальными.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости коррекции протоколов эмпирической антибиотикотерапии у пациентов с внутрибольничными пневмониями и инфекциями в области хирургического вмешательства для каждого из стационаров. Необходимо отметить, что различия в интенсивности процессов эволюции у штаммов *P. aeruginosa* связаны с различиями в политике применения антибиотиков, что еще раз доказывает необходимость локального мониторинга формирования и циркуляции штаммов, резистентных к антибактериальным химиопрепаратам. Результаты молекулярно-генетического типирования возбудителей внутрибольничных пневмоний позволяют обосновать необходимость изучения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом серийных разведений.

Литература

1. Сидоренко С.В., Резван С.П., Стерхова Г.А., Грудина С.А. // <http://science.rambler.ru/db/author.html?id=1002658>.
2. Страчунский Л.С., Решедько Г.К., Рябкова Е.Л. и др. Рекомендации по антимикробной терапии нозокомиальных инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, в отделениях реанимации и интенсивной терапии : пособие для врачей. — Смоленск: Боргес, 2002.
3. Finnan S., Morrissey J.P., O'Gara F., Fidelma Boyd E.G. // *J. Clinical Microbiology*. — 2004 — Vol. 42, No. 12. — P. 5783–5791.
4. Gamper M., Ganter B., Polito M.R., Haas D. // *J. Mol. Biol.* — 1992. Vol. 226. — P. 943–957.
5. Haley R.W., Culver D.H., White J.W. et al. // *Am. J. Epidemiol.* — 1985. — Vol. 121. — P. 159–167.
6. Iaconis J.P., Pitrin D.H., Sheikh W., Nadler H.L. // *Clin. Infect. Dis.* — 1977. — Vol. 24, Suppl. 2. — P. 191–196.
7. Pierard D., Emmerechts K., Lauwers S. // *J. Antimicrob. Chemother.* — 1998. — Vol. 41. — P. 443–450.
8. Siegman-Igra Y., Ravona R., Primerman H., Giladi M. // *Intern. J. Infect Dis.* — 1998. — Vol. 2. — P. 211–215.

Поступила в редакцию 15.03.2007.

MONITORING OF RESISTENCY TO ANTIBIOTICS OF *P. AERUGINOSA*, AGENTS OF INTRAHOSPITAL INFECTIONS

V.B. Turkutjukov, V.B. Shumatov, E.V. Slabenko, G.A. Smirnov, V.N. Krasnoshchekov, V.P. Borzov, L.M. Klimova, L.N. Lebedeva
Vladivostok State Medical University, Primorye Antiplague Station (Ussuriysk), City Clinical Hospital No. 2 (Vladivostok), Primorye Regional Clinical Hospital No. 1 (Vladivostok)

Summary — Despite of the certain progress in antibacterial therapy of the heavy hospital infections caused by *P. aeruginosa*, the frequency of failures remains to the highest. Distinctions in intensity of formation and circulation of *P. aeruginosa* resistant to antibiotics are connected to distinctions in a policy of application of antibiotics in various hospitals. The received data testify to necessity of correction of reports empirical antibiotic therapy of intrahospital pneumonias in departments of intensive therapy. Results of molecule genetic typing have shown the low efficiency of disk-diffusions method and prove the necessity of studying of sensitivity of microorganisms to antibiotics with method of serial dilutions.

Pacific Medical Journal, 2007, No. 3, p. 45–47.