

УДК 616.9-022.3:579.841.11:576.8.097.21:575.113

Э.В. Слабенко<sup>1</sup>, Л.А. Балабанова<sup>2</sup>, Л.Н. Лебедева<sup>3</sup>, Л.М. Климова<sup>4</sup>, И.В. Котова<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2а),

<sup>2</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159),

<sup>3</sup> Приморская краевая клиническая больница № 1 (690950 г. Владивосток, ул. Алеутская, 57), <sup>4</sup> Приморская краевая клиническая больница № 2 (690105 г. Владивосток, ул. Русская, 55)

## ОБЕСПЕЧЕННОСТЬ ФАКТОРАМИ ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

**Ключевые слова:** нозокомиальные инфекции, синегнойная палочка, вирулентность, гены.

Патогенность у *Pseudomonas aeruginosa* обусловлена широким арсеналом факторов вирулентности. Одним из механизмов, диктующих экспрессию факторов вирулентности, служит присущий синегнойной палочке феномен кооперативной чувствительности. Изучена генотипическая характеристика факторов вирулентности штаммов *P. aeruginosa*, циркулирующих в отделении реанимации и интенсивной терапии многопрофильного стационара, и оценена их роль в возможности развития внутрибольничных инфекций. Однако полиморфизм геновариантов (сочетания генов вирулентности) не позволяет эффективно и качественно осуществлять мониторинг формирования и циркуляции госпитальных штаммов и выявить источник инфекции.

Одной из важных особенностей, способствующих возникновению пневмонии, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*, является наличие свойств или факторов вирулентности, обуславливающих возможность развития в организме хозяина патологических изменений. К ним относятся эластазы А и В, токсины, гемолизины и поверхностно-активный рамнолипид.

Существенную роль в патогенезе данной инфекции играют эндо-, экзотоксины (*ExoS*, *ExoY*), которые ингибируют биосинтез белка и проявляют цитотоксичность в отношении легочной ткани и макрофагов [3]. Адгезия также является сигналом к синтезу белков-инвазинов и осуществляется с помощью секретруемых экзоферментов, одним из которых является эластаза [1, 3–6, 8]. Экспрессия генов вирулентности регулируется одновременно несколькими системами, однако наиболее высоким уровнем регуляции вирулентности является чувство кворума (Quorum Sensing), или феномен кооперативной чувствительности [1].

**Материал и методы.** В работе были исследованы штаммы *P. aeruginosa*, выделенные от больных с внутрибольничной пневмонией и из внешней среды отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) ГКБ № 2 (19 штаммов) и ПККБ № 1 (20 штаммов). В качестве контроля взяты штаммы *P. aeruginosa*, выделенные из клинического материала от больных с раневыми инфекциями в области хирургического вмешательства из ПККБ № 1 (28 штаммов) и ГКБ № 2 (17 штаммов).

ДНК *P. aeruginosa* получали путем экстракции фенол-хлороформом (1:1) [7]. Идентификация вирулентных штаммов была проведена методом полимеразной цепной реакции с использованием олиго-

нуклеотидов с известной нуклеотидной последовательностью (праймеров) на начало и конец гена *ExoY*, кодирующего белок секреторной системы III, и генов *LasA* и *LasB*, кодирующих протеазы. Праймеры: *pilA*: 5'-ACA-GCA-TCC-AAC-TGA-GCG-3'; *pilB*: 5'-TCG-AAC-TGA-TGA-TCG-TGG -3'; *LasA*: 5'-GCA-GCA-CAA-AAG-ATC-CC -3'; *LasB*: 5'-ACA-GGT-AGA-ACG-CAC-GGT-TG-3'; *ExoY*: 5'-TAT-CGA-CGG-TCA-TCG-TCA-GGT-3'; *ExoS*: 5'-ATC-CTC-AGG-CGT-ACA-TCC-3'. Амплификацию вышеуказанных генов проводили в 50 мкл инкубационной смеси с 2–5 нг водного раствора ДНК, по 0,2 мкМоль прямого и обратного праймеров. Использован набор реактивов Encyclo PCR kit («Евроген», Москва), включающий смесь ДНК-полимераз.

Амплификацию выполняли на амплификаторе фирмы «Эппендорф». Условия для каждого гена подбирали индивидуально. Для *ExoY* и *LasA*: (95°C – денатурация цепей ДНК, 15 с; 55°C – отжиг праймеров, 15 с; 72°C – работа полимеразы, 1 мин 10 с) – 35 циклов. Для гена *LasB*: (95°C – денатурация цепей ДНК, 15 с; 47°C – отжиг праймеров, 15 с; 72°C – работа полимеразы, 1 мин 30 с) – 35 циклов.

Статистическая обработка результатов проводилась с привлечением критерия Спирмена и отношения шансов [2].

**Результаты исследования и обсуждение полученных данных.** С целью выявления госпитальных штаммов синегнойной палочки, выделенных из клинического материала (больные с черепно-мозговыми травмами) и внешней среды ОРИТ, была предпринята попытка провести на основе сочетания исследованных генов, обеспечивающих факторы вирулентности, определить спектр распределения генетических вариантов возбудителя.

Были распределены 63 варианта сочетания исследованных в работе генотипов, обеспечивающих патогенность штаммов *P. aeruginosa* (табл. 1). Их изучение свидетельствовало о том, что штаммы 8-го и 9-го генотипов, выделенные из внешней среды ГКБ № 2, идентичны штаммам 8-го и 9-го генотипов из клинического материала (отделяемое трахеостомы).

Штаммы *P. aeruginosa* генотипов 8 и 9, полученные с объектов внешней среды отделения реанимации и интенсивной терапии ГКБ № 1, являлись госпитальными, циркулировавшими в отделении и вызвавшими экзогенную легочную патологию

Таблица 1

Генотипы факторов вирулентности штаммов *P. aeruginosa* – возбудителя внутрибольничных пневмоний (клинический материал – отделяемое из трахеостомы и мокрота)

Варианты генотипов	ГКБ № 2		ПККБ № 1	
	Клин. материал	внешняя среда	Клин. материал	внешняя среда
<b>Всего:</b>	17	2	10	10
2-й генотип: <i>PilB</i>	5	–	2	–
3-й генотип: <i>PilA-PilB</i>	1	–	–	–
7-й генотип: <i>PilB-ExoY</i>	–	–	–	1
8-й генотип: <i>PilB-ExoS</i>	2	1	–	–
9-й генотип: <i>PilB-ExoY-ExoS</i>	2	1	–	–
13-й генотип: <i>PilB-LasA</i>	1	–	–	–
23-й генотип: <i>PilB-ExoY-LasB</i>	–	–	1	–
26-й генотип: <i>PilB-ExoS-LasB</i>	–	–	–	1
31-й генотип: <i>PilB-ExoY-ExoS-LasA</i>	–	–	1	–
33-й генотип: <i>PilB-ExoY-ExoS-LasA-LasB</i>	–	–	2	1
35-й генотип: <i>PilA-PilB-ExoS</i>	–	–	1	–
42-й генотип: <i>PilA-PilB-ExoY-LasA-LasB</i>	–	–	–	1
47-й генотип: <i>PilA-PilB-ExoY-ExoS-LasB</i>	1	–	–	–
48-й генотип: <i>PilA-PilB-ExoY-ExoS-LasA-LasB</i>	–	–	–	1
49-й генотип: <i>ExoY</i>	1	–	–	–
50-й генотип: <i>ExoS</i>	1	–	–	–
54-й генотип: <i>ExoY-LasA-LasB</i>	–	–	1	1
59-й генотип: <i>ExoY-ExoS-LasB</i>	–	–	1	3
61-й генотип: <i>LasA</i>	1	–	–	1
63-й генотип: <i>LasA-LasB</i>	–	–	1	–
Нет выявляемых генов	2	–	–	–

у пациентов с черепно-мозговыми травмами, находившихся в ОРИТ.

Разнообразие сочетания набора генетически обусловленных факторов вирулентности позволило установить, что штаммы, относившиеся к геновариантам 33, 54 и 59, выделенные от пациентов с внутрибольничной пневмонией и внешней среды ОРИТ ПККБ № 1, являлись госпитальными. В качестве контроля подобной генотиповой дифференциации были подвергнуты штаммы синегнойной палочки, полученные в обоих стационарах от больных с инфекциями в области хирургического вмешательства (табл. 2).

Так, штаммы с генотипами 33 и 59 являлись внутрибольничными патогенами и могли стать причиной эндогенной инфекции в области хирургического вмешательства у пациентов в ПККБ № 1. Штаммы генотипов 19, 29, 49 и 51 выделены из клинического материала в обоих стационарах. При раневой инфекции в области хирургического вмешательства ГКБ № 2 те же генотипы 2 и 8 *P. aeruginosa*, что и из трахеостом у пациентов с внутрибольничной пневмонией, что свидетельствует о циркуляции одних и тех же генотипов в отделении.

Таблица 2

Генотипы факторов вирулентности штаммов *P. aeruginosa*, возбудителей раневых инфекций в области хирургического вмешательства

Варианты генотипов	ГКБ № 2		ПККБ № 1	
	Клин. материал	внешняя среда	Клин. материал	внешняя среда
<b>Всего:</b>	15	2	18	10
2-й генотип: <i>PilB</i>	1	–	1	–
3-й генотип: <i>PilA-PilB</i>	1	–	–	–
7-й генотип: <i>PilB-ExoY</i>	–	–	–	1
8-й генотип: <i>PilB-ExoS</i>	2	1	–	–
9-й генотип: <i>PilB-ExoY-ExoS</i>	–	1	–	–
11-й генотип: <i>PilA-LasB</i>	–	–	1	–
19-й генотип: <i>PilA-ExoS-LasA</i>	1	–	1	–
26-й генотип: <i>PilB-ExoS-LasB</i>	–	–	–	1
29-й генотип: <i>PilA-ExoY-ExoS-LasB</i>	1	–	1	–
31-й генотип: <i>PilB-ExoY-ExoS-LasA</i>	–	–	2	–
32-й генотип: <i>PilB-ExoY-ExoS-LasB</i>	–	–	1	–
33-й генотип: <i>PilB-ExoY-ExoS-LasA-LasB</i>	–	–	1	1
40-й генотип: <i>PilA-PilB-ExoY-LasA</i>	–	–	1	–
41-й генотип: <i>PilA-PilB-ExoY-LasB</i>	–	–	1	–
42-й генотип: <i>PilA-PilB-ExoY-LasA-LasB</i>	–	–	–	1
43-й генотип: <i>Pil A Pil B LasA</i>	–	–	2	–
48-й генотип: <i>PilA-PilB-ExoY-ExoS-LasA-LasB</i>	1	–	–	1
49-й генотип: <i>ExoY</i>	1	–	1	–
50-й генотип: <i>ExoS</i>	1	–	–	–
51-й генотип: <i>ExoY-ExoS</i>	1	–	1	–
52-й генотип: <i>ExoY-LasA</i>	2	–	–	–
54-й генотип: <i>ExoY-LasA-LasB</i>	–	–	–	1
59-й генотип: <i>ExoY-ExoS-LasB</i>	–	–	2	3
60-й генотип: <i>ExoY-ExoS-LasA-LasB</i>	–	–	1	–
61-й генотип: <i>LasA</i>	1	–	–	1
63-й генотип: <i>LasA-LasB</i>	–	–	1	–
Нет выявляемых генов	2	–	–	–

Штамм *P. aeruginosa* 8-го генотипа, выделенный из внешней среды, был идентичен генотипу штамма, выделенного от пациента с раневой инфекцией, и мог стать причиной гнойно-септического осложнения.

Из объектов внешней среды и клинического материала в ПККБ № 1 были выделены генотипы 2, 7, 11, 19, 26, 29, 31–33, 40–43, 48, 49, 51, 54, 59, 60, 61 и 63, что свидетельствует о широком генотиповом разнообразии *P. aeruginosa*. Варианты генотипов 33 и 59, выделенные из внешней среды стационара, вызывали инфекционные осложнения у пациентов данного стационара, т.е. стали причиной внутрибольничной раневой инфекции.

Четыре штамма 8-го варианта набора генов выделены от 2 пациентов с пневмонией, от 2 пациентов с инфекцией в области хирургического вмешательства, а также

из внешней среды ГКБ № 2, свидетельствуя о циркуляции госпитального штамма в данном стационаре.

Выявленные у штаммов *P. aeruginosa* факторы вирулентности позволили установить их этиологическую значимость в развитии внутрибольничных инфекций. Однако полиморфизм геновариантов (сочетания обнаруженных генов вирулентности) не позволяет эффективно и качественно осуществлять мониторинг формирования и циркуляции госпитальных штаммов и выявить источник инфекции.

#### Литература

1. Гинцбург А.Л., Ильина Т.С., Романова Ю.М. «QUORUM SENSING» социальное поведение бактерий // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунологии. 2003. № 5. С. 86–93.
2. Гланц С. Медико биологическая статистика / пер. с англ. М.: Практика, 1998. 459 с.
3. Сидоренко С.В., Гельфанд Е.Б., Мамонтова О.А. Госпитальные инфекции, вызванные синегнойной палочкой, значение для интенсивной терапии // Анестезиол. и реаниматол. 1999. № 3. С. 46–53.
4. Сидоренко С.В. Инфекционный процесс как «диалог» между хозяином и паразитом // Клини. микробиология и антимикроб. химиотерапия. 2001. Т. 3, № 4. С. 301–315.
5. Тец В.В., Заславская Н.В. Эффективность действия антибиотиков на бактерии в биопленках // Журн. микробиологии, эпидемиологии, иммунологии. 2005. № 5. С. 24–26.
6. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности // Клинич. микробиология и антимикроб. химиотерапия. 2005. Т. 7, № 3. С. 271–285.
7. Gamper M., Ganter B., Polito M.R., Haas D. RNA processing modulates the expression of the *areDABC* operon in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Mol. Biol. 1992. Vol. 226. P. 943–957.
8. Smith, Roger S. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target // J. Clin. Invest. 2003. Vol. 112, No. 10. P. 1460–1465.

Поступила в редакцию 06.03.2008.

#### SECURITY OF THE VIRULENT FACTORS OF THE PSEUDOMONAS AERUGINOSA STRAINS, ACTIVATORS OF THE NOZOKOMIAL INFECTIONS

E.V. Slabenko<sup>1</sup>, L.A. Balabanova<sup>2</sup>, L.N. Lebedeva<sup>3</sup>, L.M. Klimov<sup>4</sup>, I.V. Kotova<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Vladivostok State Medical University (2a Ostryakova Pr. Vladivostok 690002 Russia), <sup>2</sup>Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far-Eastern branch of the Russian Academy of Science (159 Pr.100-letiya Vladivostok 690022), <sup>3</sup>Primorsky Regional Hospital No. 1 (57 Aleutskaya St. Vladivostok 690950 Russia), <sup>4</sup>Primorsky Regional Hospital No. 2 (55 Russkaya St. Vladivostok 690105 Russia)

Summary – Pathogenicity at *Pseudomonas aeruginosa* is caused by the wide arsenal of virulent factors. One of the mechanisms dictating the expression of virulent factors is the phenomenon of cooperative sensitivity (Quorum Sensing) typical for *P. aeruginosa*. The characteristic of virulent factors of the *P. aeruginosa* strains is investigated by genotyping, circulating in ICU of a versatile hospital and their role in the opportunity of the development of intrahospital infections is appreciated. However, the polymorphism of the gene variants (virulent genes combination) does not allow to carry out effective and qualitative monitoring of the formation and circulation of the hospital strains and to reveal a source of an infection.

**Key words:** nosocomial infections, *P. aeruginosa*, virulent, genes.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 1, p. 75–77.

УДК 61-057-073.96:613.292

Г.А. Меркулова<sup>1</sup>, А.А. Шепарев<sup>2</sup>, А.А. Рыбченко<sup>1</sup>, Н.Ф. Кушнерова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Международный научно-исследовательский центр «Арктика» ДВО РАН (685000 г. Магадан, пр-т Карла Маркса, 24),

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

<sup>3</sup>Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Балтийская, 43)

## ПРИМЕНЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА Д-ГКТД-01 В ИНТЕГРАЛЬНОЙ ОЦЕНКЕ ЗДОРОВЬЯ МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ

**Ключевые слова:** здоровье, компьютерная дермография, биологически активная добавка «Калифен».

Представлены результаты анализа данных компьютерной дермографии 445 медицинских работников хирургического и терапевтического профилей. Вычисление индексов здоровья позволило отнести врачей и медсестер хирургических специальностей к 4-й группе диспансеризации. Среди специалистов терапевтического профиля к 4-й группе диспансеризации были отнесены 68% обследованных. Выраженность дисфункциональных расстройств увеличивалась пропорционально стажу работы. Также на материале 27 наблюдений положительно оценена эффективность фармакосанации с использованием биологически активной добавки «Калифен».

Многочисленные исследования показали, что профессиональная деятельность медицинских работников протекает в условиях комплексного воздействия

производственных факторов (биологических, химических, физических), а также характеризуется тяжестью и напряженностью трудового процесса. Согласно суководству Р 2.2.2006-05, условия труда здесь относятся как к допустимым (класс 2), так и к вредным (класс 3), т.е. могут при определенных условиях привести к развитию профессионального заболевания и (или) значительному росту числа хронической патологии [2]. Данные анализа литературы свидетельствуют, что регистрируемый уровень заболеваемости медицинских работников не отражает истинной ситуации. Кроме того, существующая сегодня практика проведения медицинских осмотров не дает возможности связать те или иные патологические изменения в организме обследуемого с условиями и характером его труда. Специфической особенностью деятельности медицинских работников является то,

<sup>1</sup> Меркулова Галина Анатольевна – м.н.с. лаборатории экологической нейрокибернетики МНИД «Арктика»: 690022 г. Владивосток, ул. Кирова, 95; тел.: 8 (4232) 31-33-21; e-mail: neurokib@mail.ru.