

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, МИКРОБИОЛОГИЯ, ИНФЕКЦИОННЫЕ И ПАРАЗИТАРНЫЕ БОЛЕЗНИ

EPIDEMIOLOGY, MICROBIOLOGY, INFECTIOUS AND PARASITIC DISEASES

УДК 614.2:616.6-036.22

© Коллектив авторов, 2012

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ENTEROCOCCUS FAECALIS И ENTEROCOCCUS FAECIUM В УРОЛОГИЧЕСКОМ СТАЦИОНАРЕ

EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF THE FORMATION OF PATHOGENIC PROPERTIES OF ENTEROCOCCUS FAECALIS AND ENTEROCOCCUS FAECIUM IN UROLOGICAL HOSPITAL

Б.И. Асланов¹, А.А. Долгий¹, А.Е. Гончаров¹, А.И. Архангельский²B.I. Aslanov¹, A.A. Dolgiy¹, A.E. Goncharov¹, A.I. Arkhangelskiy²¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург² Медико-санитарная часть № 70 Санкт-Петербургского государственного унитарного предприятия пассажирского автомобильного транспорта, Санкт-Петербург¹ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg² Medical Sanitary Department № 70 of Saint-Petersburg State Unitary Authority of Passenger Road Transportation, Saint-Petersburg

Контакт: Б.И. Асланов, batyra@mail.ru

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) являются наиболее встречающимися инфекционными заболеваниями в лечебно-профилактических учреждениях. Одними из наиболее значимых возбудителей ИМП являются энтерококки. В настоящее время механизмы формирования патогенных свойств данного возбудителя изучены недостаточно. У исследованных штаммов *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* из двух урологических стационаров были обнаружены фагоопосредованные гены вирулентности *yopX* и *gp2*. Эти гены чаще встречались у полиантибиотикорезистентных штаммов и возбудителей ИСМП. Было доказано формирование госпитальных штаммов у энтерококков при помощи методики RAPD-генотипирования. Наблюдался горизонтальный генетический обмен между штаммами как от одного, так и от разных пациентов генами *gp2* и *yopX*. Совершенствование мероприятий инфекционного контроля над возбудителями ИМП должно базироваться на подробном изучении взаимодействий между популяциями микробов-возбудителей ИМП и бактериофагов.

Ключевые слова: *Enterococcus*, инфекция мочевыводящих путей, фагоопосредованный фактор вирулентности.

Urinary tract infections (UTIs) are the most occurring infectious diseases in hospitals. One of the leading causative agents of UTIs is enterococcus. At present, the mechanisms of formation of the pathogenic properties of this pathogen are not well understood. In investigated strains of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from two urological departments phage encoded virulence factors *yopX* and *gp2* were found. Strains with the presence of these genes significantly more likely to cause nosocomial infections and have higher antibiotic resistance. The formation of hospital strains of enterococci was proved by RAPD genotyping method. Horizontal genetic exchange by genes *yopX* and *gp2* observed both between the strains from one and from different patients. Improving of infection control should be based on a detailed study of the interactions between populations of microbes, causative agents of UTIs, and bacteriophages.

Key words: *Enterococcus*, urinary tract infection, phage encoded virulence factor.

Введение. Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) являются наиболее часто встречающимися заболеваниями инфекционной этиологии в лечебно-профилактических учреждениях. Их доля среди всех внутрибольничных инфекций составляет примерно 22–50%, по данным наблюдений различных авторов в разных странах [1, 4, 7, 9, 12]. В общей структуре инфекционных заболеваний детского возраста ИМП занимают третье место после инфекций дыхательных путей и кишечных инфекций [5, 11]. Одним из основных возбудителей ИМП являются энтерококки [3, 7, 9, 10].

В настоящее время наблюдается активное формирование госпитальных штаммов энтерококков, обладающих значительной патогенностью и устойчивостью к применяемым лечебно-профилактическим средствам. Это приводит к увеличению сроков лечения пациента, появлению осложнений, значительному увеличению стоимости лечения ИМП. Поэтому детальное изучение механизмов формирования госпитальных штаммов является приоритетной задачей системы здравоохранения.

Благодаря последним достижениям науки, стало возможно изучение механизмов формирования госпитальных штаммов, связанных с горизонтальным генетическим обменом между бактериями. Особую роль в этом процессе играют бактериофаги, которые имеют древнюю эволюционную связь с бактериями и способны передавать довольно большие участки генома между микробами. В настоящее время профаги обнаружены в большинстве патогенных бактерий [2, 6, 8]. Исходя из этого, важной научной проблемой является изучение роли бактериофагов в формировании госпитальных штаммов возбудителей инфекций мочевыводящих путей и механизмов формирования госпитальных штаммов с целью разработки новых мероприятий по эпидемиологическому надзору.

Были описаны и секвенированы фагоопосредованные гены вирулентности энтерококков *grp2*, *uorX*, *pblA*, *pblB* [13], однако их влияние на проявления эпидемического процесса ИМП и биологические свойства клинических изолятов не изучались ранее.

Цель исследования — изучить особенности влияния циркуляции бактериофагов в урологическом стационаре на формирование патогенного потенциала штаммов *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*, вызывающих инфекции мочевыводящих путей.

Материалы и методы. С января 2010 г. по декабрь 2011 г. на базе урологического отделения МСЧ № 70 ГУП «Пассажиравтотранс» проводилось проспективное эпидемиологическое наблюдение с применением бактериологического метода, включающее определение профилей резистентности к различным антибиотикам выделенных штаммов возбудителей ИМП и выявление бактериофагов из клинического

материала от пациентов и из внешней среды отделения. Также был произведен ретроспективный анализ данных микробиологического мониторинга урологического отделения за 2008 и 2009 гг.

С декабря 2011 г. по май 2012 г. на базе урологического отделения Городской больницы № 26 города Санкт-Петербурга проводилось выборочное микробиологическое наблюдение с применением бактериологического метода, включающее определение профилей резистентности к различным антибиотикам выделенных штаммов возбудителей ИМП и выявление бактериофагов из клинического материала от пациентов и из внешней среды.

Бактериофаги выделяли из клинического материала и объектов внешней среды стационара. Выделение фагов осуществляли первоначальным суточным культивированием исследуемого образца с трехчасовыми фагочувствительными штаммами в жидкой среде с последующей проверкой литической активности фильтрата материала на твердых питательных средах.

Первичное выделение культур микроорганизмов проводили общепринятыми микробиологическими методами.

Все выделенные штаммы энтерококков подвергались генетическому типированию по методике RAPD ПЦР с применением универсального праймера R5 (5'-AACGCGCAAC-3') в концентрации 50 пмоль/мкл. Методика генотипирования была адаптирована нами для исследования уропатогенных энтерококков.

Все выделенные штаммы энтерококков подвергались генетическому исследованию методом ПЦР по наличию/отсутствию генов следующих факторов патогенности: *grp2*, *uorX*, *pblA*, *pblB*. Реакции проводили с применением следующих праймеров и условий реакции (табл. 1).

Результаты ПЦР оценивались после электрофореза в 1% агарозном геле в ультрафиолетовом освещении.

Процессы амплификации осуществлялись на амплификаторах «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) и CFX96 (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием компьютерных программ Epi Info, WHONET, SPSS, PEPI.

Результаты и обсуждение. Как показали наблюдения, в стационарах, наряду с циркуляцией госпитальных штаммов возбудителей инфекций, происходит достаточно интенсивная стихийная циркуляция их бактериофагов. Из 1406 анализов мочи пациентов и внешней среды отделения было выделено 60 вирулентных бактериофагов, достоверно подтвержденных пассажами, лизирующими индикаторные культуры микроорганизмов *Ps. aeruginosa* (21 фаг), *E. coli* (17 фагов), *Klebsiella* (5 фагов), *Enterococcus* (6 фагов), *Proteus* (11 фагов), с использованием методик хлороформирования, центрифугирования и бактериальной фильтрации.

Таблица 1

Праймеры, использованные в настоящем исследовании

Ген	Наименование праймера	Последовательность (5'–3')	Размер ПЦР-продукта, н.п.	Т отжига, °С	Ссылка на источник
gp2	gp2F	ACCGTAATGACAGCGTGAGGGT	195	61	Настоящее исследование
	gp2R	AGCCGAAACTGCTGCCCAGTC			
yopX	yopXF	AGATGGTGTGACCCAGAGGA	235	57	
	yopXR	ACCCATGGTTCAATTCTTTTGCGA			
pblA	pblAF	GCTCGCGAAGCCGACGGATA	817	62	
	pblAR	ACGCCGCTACTAACCCACGA			
pblB	pblBF	GGTGCAATGGTCGGAGACAGCC	180	62	
	pblBR	AGCTGAGCCTACTTTTGCCGGT			

Среди штаммов энтерококков, выделенных от пациентов урологического отделения МСЧ № 70 за период исследования, 83,4% обладали фагорезистентностью, что позволило предположить у данных штаммов наличие профагов. Клинические изоляты от пациентов урологического отделения ГБ № 26 также характеризовались высокой фагорезистентностью (84,8%).

Бактериофаги, находясь в одной экологической нише с бактериями-хозяевами, повидимому, распространяются в стационарах так же, как и возбудители внутрибольничных инфекций, посредством рук медицинского персонала, медицинского инструментария и объектов внешней среды, выступающих в качестве факторов передачи.

Было исследовано 113 и 33 штамма *Enterococcus* sp., выделенных от пациентов урологических отделений МСЧ № 70 и ГБ № 26 соответственно.

Клинические штаммы энтерококков были исследованы на присутствие генов фагоопосредованных факторов вирулентности: гена *gp2* (профаговый ген, ответственный за повышение адгезивных способностей микроба), гена *yopX* (профаговый ген, способный повышать вирулентность штамма), гены *pblA* и *pblB* (профаговые гены, ответственные за способность микроба к агрегации тромбоцитов человека).

Было проведено RAPD ПЦР-генотипирование всех исследуемых штаммов энтерококков с универсальным праймером R5 (рис. 1).

Были определены клональные линии штаммов, встречающихся в стационаре в течение длительного времени и выделяемых от разных пациентов, что доказывало их принадлежность к госпитальным штаммам.

Отметим, что 62 (54,9%) из 113 изученных штаммов энтерококков от пациентов МСЧ № 70 относились к трём доминирующим клональным линиям (EN 1, EN 13, EN 18). Наиболее преобладающей явилась клональная ли-

ния, соответствующая RAPD-генотипу EN 1 (46 (40,7%) штаммов).

Штаммы клональной линии EN 1 циркулировали в стационаре в течение всего периода наблюдения, поражали многих (34) пациентов, выявлялись от пациентов с заносами как ИМП, так и ИСПМ. Данные обстоятельства свидетельствуют о том, что циркуляция данного штамма на отделении поддерживается за счёт повторных заносов штамма недолеженными пациентами и что штаммы генотипа EN 1 обладают высокой адаптацией к госпитальной среде и устойчивостью к элиминации применяемыми лечебно-профилактическими средствами.

34 штамма энтерококков, выделенных от пациентов ГБ № 26, были отнесены к 15 клональным линиям. Отметим наличие двух доминирующих клональных линий – 1 и 12, к которым относятся 6 (17,6%) и 9 (26,5%) штаммов соответственно.

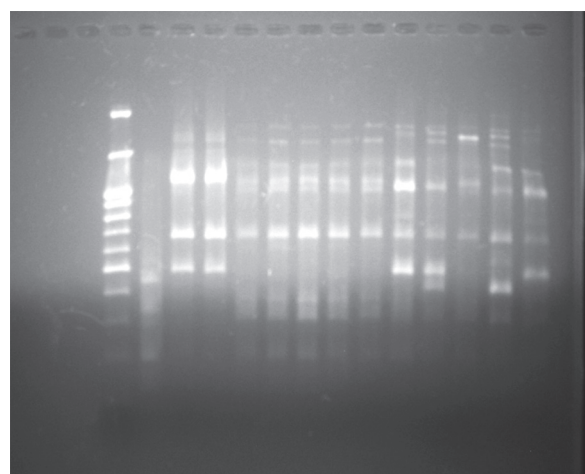


Рис. 1. Результат RAPD-генотипирования 12 штаммов *Enterococcus faecalis*

Отметим, что фаговые гены уорХ и gr2 были широко распространены среди штаммов трёх доминирующих клональных линий (генотипов EN 1, EN 13, EN 18), при этом они часто встречались в ассоциации.

У 2 пациентов наблюдалось приобретение фагоопосредованных генов вирулентности в процессе прохождения терапии на отделении. Следует отметить, что при этом RAPD-генотип микроба (EN 13 и EN 27) не был подвержен изменениям. Во многих случаях отмечается вариативность присутствия генов вирулентности у штаммов одной клональной линии. Таким образом, можно предполагать явление горизонтального генетического обмена между штаммами возбудителей ИМП, сопровождающегося потерей или приобретением небольших участков генома. Учитывая фаговую природу данных генов, высока вероятность осуществления их передачи бактериофагами.

Таким образом, можно сделать вывод, что в урологическом стационаре есть условия для перекрёстных заражений пациентов различными штаммами возбудителей ИСМП и, возможно, различными бактериофагами. Основными источниками ИСМП являются больные. Основными местами инфицирования пациентов являются перевязочная и цистоскопический кабинет. Факторами передачи инфекции при заражении больных, скорее всего, являются медицинский инструментарий и руки медицинского персонала.

Среди генов фагоопосредованных факторов вирулентности преобладали в популяции изучаемых энтерококков возбудителей ИМП ген уорХ (у 38 штаммов в МСЧ № 70 (33,6%) и 17 (51,5%) в ГБ № 26) и ген gr2 (у 37 штаммов в МСЧ № 70 (32,7%) и 16 (48,5%) в ГБ № 26). Ассоциация данных генов была выявлена у 28 штаммов (24,8%) в МСЧ № 70 и у 12 (36,4%) штаммов в ГБ № 26. Генов pblA и pblB у штаммов из МСЧ № 70 обнаружено не было. Следует обратить внимание на штамм *Enterococcus faecium* № 655 от 1 пациента, включающий ассоциацию 3 фаговых генов вирулентности (gr2, уорХ, pblA) и обладающий резистентностью ко всем антибиотикам, кроме линезолида и ванкомицина (пограничная чувствительность). В ГБ № 26 ген pblB был выявлен у двух штаммов, ген pblA — у одного штамма. Отметим более высокую встречаемость фаговых факторов вирулентности у штаммов от пациентов урологического отделения ГБ № 26.

При сравнении частоты ИСПМ у пациентов МСЧ № 70, от которых были выделены *Enterococcus faecalis* с наличием фаговых генов gr2 и уорХ, было обнаружено, что распространение штаммов с фагоопосредованным фактором патогенности выше (52,7 на 100 пациентов, 95% ДИ = 38 – 67,3 и 50 на 100 пациентов 95% ДИ = 35,33 – 64,67 соответственно) по сравнению со штаммами без фагоопосредованных генов вирулентности (29 на 100 пациентов, 95%

ДИ = 38 – 67,3 и 30,4 на 100 пациентов, 95% ДИ = 21,38 – 40,79) (рис. 2).

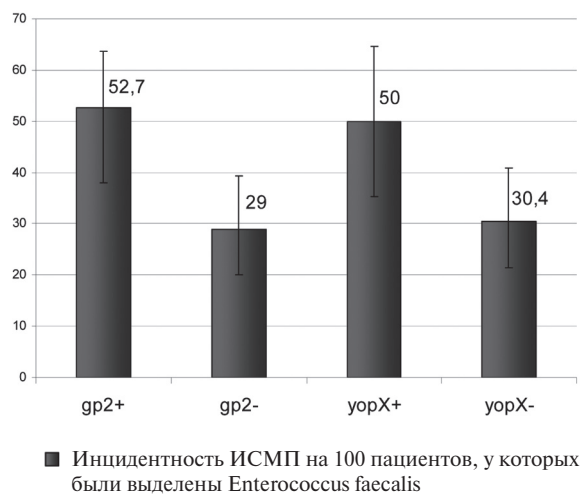


Рис. 2. Сравнение частоты ИСПМ у пациентов с *Enterococcus faecalis* с наличием фагоопосредованных факторов патогенности gr2 и уорХ и без них

При сравнении частоты ИСПМ у пациентов МСЧ № 70, от которых были выделены *Enterococcus faecium* с наличием гена gr2, было выявлено, что распространение штаммов с фаговым фактором вирулентности несколько ниже (36,84 на 100 пациентов, 95% ДИ = 16,3 – 61,64) по сравнению со штаммами без фагоопосредованных факторов вирулентности (40 на 100 пациентов, 95% ДИ = 16,34 – 67,71).

При сопоставлении частоты ИСПМ у пациентов МСЧ № 70, от которых были выделены *Enterococcus faecium* с наличием гена уорХ, было выявлено, что распространение штаммов с фаговым геном вирулентности выше (42,86 на 100 пациентов, 95% ДИ = 23,31 – 64,26) по сравнению со штаммами без фагоопосредованных факторов вирулентности (33,33 на 100 пациентов, 95% ДИ = 13,38 – 59,21).

Оценка влияния наличия у штаммов генов gr2 и уорХ на полиантибиотикорезистентность энтерококков проводилась в аналитическом исследовании типа случай – контроль. У штаммов, выделенных от пациентов урологического отделения МСЧ № 70, было выявлено наличие сильной положительной связи как для гена gr2: ОШ = 5,04 (95% ДИ = 1,06 – 47,33), так и для гена уорХ: ОШ = 3 (95% ДИ = 0,76 – 17,21). У штаммов, выделенных от пациентов ГБ № 26, также наблюдается наличие сильной положительной связи для генов gr2: ОШ = 10,18 (95% ДИ = 1,24 – 244,21) и уорХ: ОШ = 9,6 (95% ДИ = 0,89 – 468,44). Следует отметить, что для гена уорХ в обоих случаях не получилось статистически значимо подтвердить наличие сильной положительной связи.

Штаммы *Enterococcus faecalis* с наличием гена *gr2* высевались от пациентов с простатитом в 58,3% случаев, циститом — в 50% случаев и пиелонефритом — в 50% случаев. Штаммы *Enterococcus faecalis* с наличием гена *uorX* высевались от пациентов с пиелонефритом в 63,6% случаев, циститом — в 54,5% случаев и простатитом — в 45,5% случаев.

Штаммы *Enterococcus faecium* с наличием гена *gr2* высевались от пациентов с пиелонефритом в 64,3% случаев, простатитом — в 57,2% случаев, циститом — в 21,4% случаев. Штаммы *Enterococcus faecium* с наличием гена *uorX* высевались от пациентов с пиелонефритом в 60% случаев, с простатитом — в 60% случаев и с циститом — в 26,7% случаев.

Наличие изучаемых генов вирулентности у штаммов уропатогенных энтерококков не повлияло на увеличение продолжительности госпитализации пациентов урологического отделения МСЧ №70: средняя продолжительность госпитализации инфицированных штаммами с наличием гена *gr2* составила 14,07 суток, с отсутствием гена — 14,89 суток; средняя продолжительность госпитализации инфицированных штаммами с наличием гена *uorX* составила 14,73 суток, с отсутствием гена — 14,87 суток. Увеличения длительности катетеризации у пациентов МСЧ №70, инфицированных штаммами с наличием генов *gr2* (6,2 суток) и *uorX* (6,33 суток), по сравнению с пациентами, не инфицированными данными штаммами (6,33 суток и 6,32 суток соответственно), не отмечалось.

Частота возникновения заболеваний средней тяжести у пациентов МСЧ №70, инфицированных штаммами *Enterococcus faecalis* с наличием гена *gr2*, составила 33,3 на 100 пациентов; с наличием гена *uorX* — 36,4 на 100 пациентов. Частота возникновения заболеваний средней тяжести у пациентов МСЧ №70, инфицированных штаммами *Enterococcus faecium* с наличием гена *gr2*, составила 74,1 на 100 пациентов; с наличием гена *uorX* — 66,7 на 100 пациентов.

Штаммы *Enterococcus faecalis*, выделенные от пациентов МСЧ №70 с ИМП в 2008–2011 гг., имеют значительную устойчивость к стрептомицину (95,1%), тетрациклину (87,5%), эритромицину (76,1%), кларитромицину (72,7%) и меропенему (71%).

При сравнении данных антибиотикорезистентности *Enterococcus faecalis* за 2008 и 2011 гг. было выявлено значительное увеличение уровня резистентности изолятов к гентамицину и фторхинолонам (ципрофлоксацину и офлоксацину) (табл. 2).

Отметим, что циркулирующие в стационаре штаммы обладают выраженной полиантибиотикорезистентностью к большинству применяемых препаратов. Увеличение устойчивости к антибиотикам, вероятно, связано с нерациональным применением данных препаратов в ходе антибактериальной терапии пациентов.

Необходимо назначение антибиотиков, к которым выработалась значительная устойчивость видов бактерий, только после оценки степени чувствительности возбудителей у каждого конкретного пациента. В случаях значительной полиантибиотикорезистентности возбудителя ИМП возможно применение в терапевтических целях препаратов бактериофагов, высоко вирулентных по отношению к этому возбудителю.

Таблица 2

Сравнение показателей резистентности к антибиотикам изолятов Enterococcus faecalis, выделенных в 2008 и 2011 гг.

Антибиотик	% устойчивых штаммов, 2008 г.	% устойчивых штаммов, 2011 г.
Пенициллин	57,6	32,3
Ампициллин	12,9	8,1
Пиперацillin	15,6	6,6
Меропенем	75	82,3
Гентамицин	20,7	56,5
Рифампицин	46,9	15
Ципрофлоксацин	28,1	52,5
Офлоксацин	22,6	51,7
Кларитромицин	65,2	71
Эритромицин	84,8	70
Нитрофурантоин	30	4,8
Ванкомицин	0	0
Хлорамфеникол	60,9	55,2
Тетерциклин	92,9	85,5

Заключение. В обоих изучаемых стационарах наблюдаются процессы формирования и циркуляции госпитальных штаммов энтерококков.

Наряду с циркуляцией возбудителей ИМП, в урологическом отделении наблюдается стихийная циркуляция бактериофагов.

Большинство штаммов энтерококков обладали выраженной фагорезистентностью, что косвенно указывает на высокий процент лизогенных штаммов.

У большинства штаммов энтерококков с наличием фагоопосредованных факторов вирулентности наблюдается тенденция к увеличению частоты ИСПМ среди пациентов и полиантибиотикорезистентность. Нередко такие штаммы вызывают инфекционные осложнения, в том числе у пациентов с состоянием средней тяжести. Очевидны высокая вирулентность данных штаммов и их развитые способности к адаптации в условиях госпитальной среды, способствующие возможностям к эпидемическому распространению в популяции пациентов урологического отделения.

С позиций эпидемиологии следует уделить внимание дальнейшему изучению влияния бактериофагов на формирование резистентности микробов к применяемым средствам лечебно-профилактического процесса, свойств вирулентности микробов и способности к эпидемическому распространению в популяции людей.

Изучение данных процессов необходимо для решения проблем терапии и профилактики ИМП, а также разработки новых мероприятий по эпидемиологическому надзору над возбудителями ИМП и для прогнозирования развития эпидемического процесса ИМП.

Литература

1. Агеев А.К. Современные госпитальные инфекции / А.К. Агеев // Клиническая медицина. — 1987. — № 11. — С. 3–10.
2. Крылов В.Н. Роль горизонтального переноса генов бактериофагами в возникновении патогенных бактерий / В. Н. Крылов // Генетика. — 2003. — № 5. — С. 595–620.
3. Рафальский В.В. Резистентность возбудителей амбулаторных инфекций мочевыводящих путей по данным многоцентровых микробиологических исследований UTIAP-1 и UTIAP-11 / В.В. Рафальский [и др.] // Урология. — 2004. — № 2. — С. 13–17.
4. Al-Asmary S.M. Nosocomial urinary tract infection. Risk factors, rates and trends / S.M. Al-Asmary [et al.] // Saudi Med J. — 2004. — V. 25 (7). — P. 895–900.
5. Bell L.E. Update on childhood urinary tract infection and vesicoureteral reflux. / L.E. Bell, T.K. Mattoo // Semin Nephrol. — 2009. — V. 29 (4). — P. 349–359.
6. Brüssow H. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion / H. Brüssow, C. Canchaya, W.D. Hardt // Microbiol Mol Biol. — 2004. — V. 68 (3). — P. 560–602.
7. Drekonja D.M. Urinary tract infections / D.M. Drekonja, J.R. Johnson // Prim Care. — 2008. — V. 35 (2). — P. 345–367.
8. Hendrix R.W. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage / R.W. Hendrix [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. — 1999. — V. 96 (5). — P. 2192–2197.
9. Mayhall C.G. Hospital Epidemiology and Infection Control, 3rd Edition / C.G. Mayhall // Lippincott Williams & Wilkins. — 2004. — P. 2060.
10. Piljić D. Etiological factors of community acquired urinary tract infections in hospitalized patients / D. Piljić [et al.] // Med Arh. — 2009. — V. 63 (3). — P. 128–132.
11. Taneja N. Pediatric urinary tract infections in a tertiary care center from north India. / N. Taneja [et al.] // Indian J Med Res. — 2010. — V. 5. — P. 101–131.
12. Weber G. Changing trends in frequency and antimicrobial resistance of urinary pathogens in outpatient clinics and a hospital in Southern Israel, 1991–1995 / G. Weber [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 1997. — V. 16 (11). — P. 834–838.
13. Yasmin A. Comparative genomics and transduction potential of *Enterococcus faecalis* temperate bacteriophages. / A Yasmin [et al.] // J. Bacteriol. — 2010. — V. 192 (4). — P. 1122–1130.

УДК 616-053.2:579.861.2

© Коллектив авторов, 2012

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА МЕТИЦИЛЛИН-РЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ В ПЕДИАТРИЧЕСКОМ ОТДЕЛЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКОГО СТАЦИОНАРА

THE GENETIC STRUCTURE OF METHICILLIN-RESISTANT STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* ISOLATED IN A PEDIATRIC UNIT OF AN ONCOLOGY HOSPITAL

А.Е. Гончаров¹, Т.Ю. Галунова², Л.П. Зуева¹, В.В. Колоджиева¹, А.С. Мохов¹,
К.А. Агапов¹, Н.А. Шаляпина¹, Н.Р. Сагиева¹
A.E. Goncharov¹, T.Yu. Galunova², L.P. Zueva¹, V.V. Kolodzhieva¹, A.S. Mochov¹,
K.A. Agapov¹, N.A. Shalyapina¹, N.R. Sagieva¹

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

²Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg

²Scientific Research Institute of Oncology named after N.N. Petrov, Saint-Petersburg

Контакт: А.Е. Гончаров, e-mail: molepid@mail.ru

Изучены генетические характеристики MRSE, включая идентификацию штаммов, несущих ген *isaA*, среди изолятов, выделяемых в популяции детей, находящихся на лечении в онкологическом стационаре. Методом MLVA-типирования изучена клональная структура

17 штаммов метициллин-резистентного *Staphylococcus epidermidis*. Проведена амплификация гена биопленкообразования *icaA*. Выявлена циркуляция 6 MLVA-типов MRSE, 3 из которых являлись *icaA*-позитивными. Геном *icaA* обладали все штаммы, выделенные из крови пациентов. Необходимо эпидемиологическое наблюдение за циркуляцией в стационарах *icaA*-позитивных штаммов MRSE.

Ключевые слова: MRSE, генотипирование, MLVA, *icaA*, эпидемиологическое наблюдение.

Genotypic characteristics of methicillin-resistant strains of *S. epidermidis* circulated in pediatric oncology hospital, including *icaA*-positive strains identification, were studied. Using MLVA the genotypic structure of a 17 hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains has been studied. Determination of the gene *icaA* which determines biofilm formation by polymerase chain reaction was performed. Circulation of six MLVA-types including 3 *icaA*-positive has been demonstrated. The gene was found in all blood cultures. The epidemiological surveillance of circulating in hospitals *icaA*-positive strains of MRSE should be conducted.

Key words: MRSE, molecular typing, MLVA, *icaA*, epidemiological surveillance

Введение. Коагулазонегативные стафилококки играют значительную роль в возникновении инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

Наибольшую клиническую и эпидемиологическую значимость в данной группе микроорганизмов приобретают устойчивые к метициллину (оксациллину) штаммы *Staphylococcus epidermidis* (MRSE), с внутрибольничным инфицированием которыми связывают возникновение значительного числа случаев инфекций кровотока [3, 8]. Устойчивость к оксациллину у MRSE сопряжена с множественной лекарственной устойчивостью, что создает существенные проблемы для эффективной антибактериальной терапии, а способность к формированию биопленок способствует колонизации этим микроорганизмом внутрисосудистых устройств и медицинского инструментария.

Особую актуальность стафилококковые инфекции приобретают в онкологических стационарах [6]. Это связано с выраженной иммуносупрессией пациентов, обусловленной как течением основного заболевания, так и проводимым лечением, что вызывает развитие гнойно-септических инфекций эндогенного и экзогенного происхождения и влечет за собой необходимость частого использования различных схем противомикробной терапии.

Кроме того, пациенты с онкологическими заболеваниями находятся в стационаре длительное время, и на протяжении лечения возникает необходимость в продолжительном использовании внутрисосудистых устройств, что обуславливает высокий риск возникновения инфекций кровяного русла. Важнейшей группой риска для внутрибольничного инфицирования MRSE являются дети раннего возраста [9]

В отечественной литературе практически отсутствуют данные об эпидемиологической значимости *S. epidermidis* в развитии инфекций, связанных с медицинской помощью (далее ИСМП) у пациентов онкологического профиля, в частности, не изучен вопрос о возможности формирования в онкологических стационарах госпитальных штаммов MRSE.

Исследования в этой области ограничены ввиду отсутствия в практике эпидемиологического надзора за ИСМП эффективных методов внутривидового типирования эпидермального стафилококка, в частности, методов, позволяющих выявлять вирулентные штаммы MRSE.

В настоящее время для внутривидового типирования MRSE с эпидемиологическими целями предложены различные молекулярно-генетические методики, основанные на ПЦР с произвольными праймерами (RAPD-ПЦР), электрофорезе в пульсирующем поле, мультилокусном секвенировании-типировании, мультилокусном анализе варибельного числа tandemных повторов (мультилокусный VNTR-анализ, MLVA) [1, 4, 5, 10]. Из перечисленных методик наиболее привлекательной для практического использования в лечебно-профилактических учреждениях представляется методика MLVA, которая обеспечивает хорошую межлабораторную воспроизводимость и имеет достаточно высокую разрешающую способность, наряду с относительно невысокой стоимостью исследования.

Ранее было показано, что инвазивные изоляты *S. epidermidis*, в отличие от изолятов, выделяемых с кожи, обладают генами оперона *icaABCD*, в частности, геном межклеточного адгезина *icaA*, продукт которого ответственен за образование биопленок [11].

Идентификация данных генов, таким образом, может быть использована для обнаружения штаммов, представляющих наибольшую эпидемиологическую опасность в госпитальных условиях.

В настоящее время практически отсутствуют данные о клональной структуре и патогенном потенциале метициллин-резистентных штаммов *S. epidermidis*, циркулирующих в российских стационарах.

Цель исследования — изучение генетической структуры MRSE, включая идентификацию штаммов, несущих ген *icaA*, среди изолятов, выделяемых в одной из популяций высокого риска инфицирования этим микроорганизмом — в популяции детей, находящихся на лечении в онкологическом стационаре.

Материалы и методы. В исследование включены изоляты, выделенные у пациентов педиатрического отделения онкологического стационара, поступавших для лечения в течение 6 месяцев (с апреля по сентябрь) 2011 г. Во всех случаях культуры были выделены у пациентов в срок не ранее чем через 48 ч после поступления, что позволяет предположить их госпитальное происхождение.

Характеристика изученных культур представлена в таблице.

Видовую идентификацию микроорганизмов и определение чувствительности к антибиотикам осуществляли на микробиологическом анализаторе MicroScan autoSCAN-4 (Siemens, ФРГ). Данные об антибиотикорезистентности интерпретировали согласно требованиям CLSI, в частности, к метициллин-резистентным относили штаммы, устойчивые к концентрациям оксациллина, большим, чем 2 мг/л.

Клональную принадлежность изучаемых культур определяли методом MLVA по 5 локусам с использованием праймеров и условий реакции, предложенных A. Johansson et al. [5].

Для амплификации гена биопленкообразования *icaA* были сконструированы праймеры

icaA814F 5'-GACCTCGAAGTCAATAGAGGT-3' и *icaA814R* 5'-CCCAGTATAACGTTGGATACC-3', соответствующие позициям 2334538–2334558 и 2335351–2335331 в геноме штамма *S. epidermidis* RP62A (GenBank №: CP000029.1).

Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы ООО «Бигль» (Санкт-Петербург).

При амплификации была проведена предварительная денатурация при 94°C в течение 2 мин с последующими 35 циклами амплификации (30 с денатурации при 94°C, 30 с отжига при 53°C, 45 с удлинения при 72°C) и финальным удлинением при 72°C в течении 5 мин. Амплификацию проводили на многоканальном амплификаторе «Термик» фирмы «ДНК-Технология» (Москва).

Результаты и обсуждение. Молекулярно-генетическое типирование методом MLVA позволило идентифицировать 11 MLVA-типов MRSE. 5 MLVA-типов были представлены единичными культурами, остальные 6 включали по две культуры каждый (см. табл.). В частности, идентичными оказались изоляты, выделенные у пациентов 4 и 6, 5 и 7, 8 и 9, 12 и 14, 10 и 16, 11 и 13. Таким образом, в отделении отмечена циркуляция 6 MLVA-типов, к которым отнесено 12 из 17 (70,58%) протестированных культур.

Характеристика изученных культур MRSE и результаты их генетического типирования

Пациент	Дата выделения культуры	Материал	Число tandemных повторов в VNTR локусах					icaA
			SE1	SE2	SE3	SE4	SE5	
1	29.03.11	Зев	9	4	11	4	0	—
2	07.04.11	Носоглотка	13	2	15	3	0	—
3	21.04.11	Носоглотка	38	2	13	4	62	—
4	21.04.11	Носоглотка	10	1	14	25	62	—
5	17.05.11	Носоглотка	9	1	14	4	84	—
6	23.05.11	Носоглотка	10	1	14	25	62	—
7	31.05.11	Носоглотка	9	1	14	4	84	—
8	03.06.11	Моча	10	2	15	4	62	—
9	16.06.11	Носоглотка	10	2	15	4	62	—
10	08.07.11	Кровь	44	4	11	2	62	+
11	15.08.11	Кровь	10	2	11	2	73	+
12	16.08.11	Моча	38	1	13	4	62	+
13	16.08.11	Кровь	10	2	11	2	73	+
14	18.08.11	Носоглотка	38	1	13	4	62	+
15	09.09.11	Моча	44	2	11	2	62	—
16	19.09.11	Кровь	44	4	11	2	62	+
17	20.09.11	Носоглотка	38	2	14	25	7	—

Следует отметить, что ген *isaA* был идентифицирован у 5 из 17 протестированных штаммов, в том числе у всех изолятов, выделенных из крови. Штаммы, обладающие этим геном, были отнесены к 3 MLVA-типам: 44,4,11,2,62; 10,2,11,2,73; 38,1,13,4,62 (последовательность из пяти цифр в обозначении каждого MLVA-типа соответствует числу tandemных повторов в VNTR – локусах SE1, SE2, SE3, SE4 и SE5 соответственно).

Госпитальная популяция метициллин-резистентных штаммов эпидермального стафилококка оказалась генетически гетерогенной. Тем не менее, проведенное генетическое типирование показало, что обнаружение значительной части выделенных изолятов явилось следствием их распространения в отделении за счет перекрестного внутрибольничного инфицирования пациентов.

Обращает на себя внимание идентификация кластера случаев бактериемий, обусловленных *isaA*-позитивными штаммами MRSE двумя MLVA-типов в августе – сентябре 2011 г.

Каждый из перечисленных штаммов, обладая способностью к формированию биопленок и адгезии к поверхностям внутрисосудистых устройств, потенциально способен к укоренению и длительной циркуляции в больничной среде. Поэтому необходимо постоянное эпидемиологическое наблюдение за появлением таких штаммов, а в случае дальнейшего обнаружения подобных генотипов – принятие противоэпидемических мер.

Одновременное появление *isaA*-позитивных штаммов нескольких MLVA-типов позволяет предположить возможность горизонтального генетического обмена с межклональным переносом соответствующего участка ДНК. На такую возможность ранее указывали S. Kozitskaya et al. (2005), основываясь на том, что *isa*-позитивные и *isa*-негативные штаммы MRSE, обуславливающие развитие катетер-ассоциированных инфекций, могут быть отнесены на основании мультилокусного секвенирования-типирования к одному клональному комплексу [7]. Авторами подчеркивается значимость мобильных генетических элементов, в частности, инсерционной последовательности IS256 в обеспечении мобильности генома *S. epidermidis*.

Необходимо отметить, что продукты генов *isaADBC*-оперона, в частности, поли-N-ацетилглюкозамин рассматриваются в качестве перспективного компонента стафилококковых вакцин [2]. Распространение в стационарах *isaA*-позитивных штаммов MRSE, в том числе ассоциированных с тяжелыми катетер-ассоциированными инфекциями, является весомым аргументом в пользу разработки именно этого типа вакцин.

Заключение. Проведенные исследования позволяют рекомендовать комплексный подход к молекулярно-генетическому мониторингу за

MRSE, в рамках которого, на наш взгляд, целесообразно, наряду с использованием методов определения клоальности изучаемых штаммов (например, MLVA), использовать методы идентификации генов, формирующих патогенный потенциал этого актуального возбудителя внутрибольничных инфекций. В частности, необходимо постоянное эпидемиологическое наблюдение за *isa*-позитивными клонами метициллин-резистентного эпидермального стафилококка.

Представленная работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 12-04-31195 мол-а и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг., ГК № 14.740.11.0173

Литература

1. Bonilla H. Multicity outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with clonal spread of a cfr-containing strain / H. Bonilla [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2010. – № 51 (7). – P. 796–800.
2. Cerca N. Molecular basis for preferential protective efficacy of antibodies directed to the poorly acetylated form of staphylococcal poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine / N. Cerca [et al.] // Infect. Immun. – 2007. – № 75 (7). – P. 3406–3413.
3. Cheung G.Y. Understanding the significance of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia in babies and children / G.Y. Cheung, M. Otto // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2010. – № 23 (3). – P. 208–216.
4. Dautle M.P. Typing and subtyping of 83 clinical isolates purified from surgically implanted silicone feeding tubes by random amplified polymorphic DNA amplification / M.P. Dautle, R.L. Ulrich, T.A. Hughes // J. Clin. Microbiol. – 2002. – № 40 (2). – P. 414–421.
5. Johansson A. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for typing of *Staphylococcus epidermidis* / A. Johansson [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2006. – № 44 (1). – P. 260–265.
6. Muldrew K.L. Clonal Dissemination of *Staphylococcus epidermidis* in an Oncology Ward / K.L. Muldrew, Y.W. Tang // J. Clin. Microbiol. – 2008. – № 46(10). – P. 3391–3396.
7. Kozitskaya S. Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing / S. Kozitskaya [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2005. – № 43 (9). – P. 4751–4757.
8. Schoenfelder S.M. Success through diversity – how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen / S.M. Schoenfelder [et al.] // Int. J. Med. Microbiol. – 2010. – № 300 (6). – P. 380–386.
9. Villari P. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period / P. Villari, C. Sarnataro, L. Iacuzio // J. Clin. Microbiol. – 2000.
10. Wang X.M. Evaluation of a multilocus sequence typing system for *Staphylococcus epider-*

midis / X.M. Wang [et al.] // J. Med. Microbiol. — 2003. — № 52 (Pt 11). — P. 989–998.

11. Ziebuhr W. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) and phase variation in

Staphylococcus epidermidis blood culture strains and mucosal isolates / W. Ziebuhr [et al.] // Infect. Immun. — 1997. — № 65. — P. 890–896.

УДК 616.36-002.2:616.36-008.64

© Коллектив авторов, 2012

ХРОНИЧЕСКИЙ ГЕПАТИТ И ЛАТЕНТНАЯ ПЕЧЕНОЧНАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ

CHRONIC HEPATITIS B AND LATENT HEPATIC ENCEPHALOPATHY

Л.А. Тетерина, П.В. Селиверстов, Е.А. Чихачева, В.Г. Радченко

L.A. Teterina, P.V. Seliverstov, E.A. Chikhacheva, V.G. Radchenko

*Северо-Западный государственный медицинский университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg*

Интерес к изучению осложнений заболеваний печени, в частности латентной печеночной энцефалопатии, обусловлен широким ее распространением, трудностью диагностики, отсутствием дифференцированных подходов к лечению. Выявленная корреляционная зависимость влияния степени дисбиоза на развитие латентной печеночной энцефалопатии способствует формированию полиорганной патологии, в том числе связанной с нарушением кишечного микробиоценоза при хроническом гепатите, является отдельным звеном патогенеза печеночной энцефалопатии. Дисбиоз толстой кишки у больных хроническими заболеваниями печени является триггерным фактором развития латентной печеночной энцефалопатии, а его степень напрямую коррелирует со временем выполнения тестов связи чисел и линии, проявлением астеновегетативного синдрома, кишечной диспепсии, цитолиза, холестаза, печеночно-клеточной недостаточности.

Ключевые слова: хронический гепатит, латентная печеночная энцефалопатия, дисбиоз толстой кишки.

The interest displayed to liver disease complications, to latent liver encephalopathy in particular, is due to its wide distribution, difficulty of diagnostics and lack of differential approaches to treatment. The revealed correlation dependence of dysbiosis degree influence on the latent liver encephalopathy development provides polyorgan pathology formation, including that connected with intestinal microbiocenosis disorder in chronic hepatitis, and is a special feature in liver encephalopathy development. Large intestine dysbiosis in patients with liver chronic disease serves a trigger factor for the development of latent liver encephalopathy, and its degree correlates directly with the time of tests for the connection of numbers and line, manifestation of astenovegetative syndrome, intestinal dyspepsia, cytolysis, cholestasis, liver cell insufficiency.

Key words: chronic hepatitis, latent liver encephalopathy, large intestine dysbiosis.

Введение. Термин «печеночная энцефалопатия» (ПЭ) представляет собой комплекс потенциально обратимых нервно-психических нарушений, возникающих как следствие острой и/или хронической печеночной недостаточности и/или портосистемного шунтирования крови. Согласно современной классификации портосистемной (печеночной) энцефалопатии Herber и Schomerus (2000), выделяется две стадии: латентная и клинически выраженная [10]. Интерес к изучению осложнений заболеваний печени, в частности, латентной печеночной энцефалопатии (ЛПЭ) обусловлен широким ее распространением, трудностью диагностики, отсутствием дифференцированных подходов к лечению [5,6]. До настоящего времени частота встречаемости психомоторных нарушений среди больных хроническим гепатитом (ХГ) остается малоизученной. Однако распознавание и лечение латентной печеночной энцефалопатии (ЛПЭ) при ХГ край-

не важно по трем причинам [8]: во-первых — частота ее диагностики у больных хроническими гепатитами составляет более 55%, не зависит от его этиологии и увеличивается до 77% у больных с циррозом печени [1–3]; во-вторых — способна влиять на качество повседневной жизни, приводя к снижению работоспособности; в-третьих — ЛПЭ сопровождается неадекватной реакцией пациента в экстремальных условиях, что сопряжено с повышенным риском ситуаций, опасных для жизни. На основании вышеизложенного, диагностика, лечение ЛПЭ у больных ХГ является одной из основных задач врача клинициста.

Патогенез ПЭ представляется многофакторным процессом, который протекает параллельно на 2 уровнях — уровне печени и головного мозга [1, 4, 9]. Формирование полиорганной патологии, в том числе связанной с кишечным дисбиозом при ХГ, является отдельным звеном

патогенеза ПЭ [1, 4]. Данное наблюдение подтверждается тем, что нарушения кишечной микрофлоры встречаются более чем у 90% больных ХГ [6, 7]. Все же до настоящего времени недостаточно изученными являются вопросы, касающиеся степени выраженности кишечного дисбиоза у больных ХГ, роли изменения нормального микробиоценоза кишечника в развитии ЛПЭ, а также динамики и направленности указанных изменений на фоне лечения. Таким образом, учитывая все вышеизложенное, мы сформулировали цель настоящей работы.

Цель исследования — изучить качественный, количественный состав микрофлоры толстой кишки и взаимосвязь изменений микробиоценоза толстой кишки больных ХГ на формирование ЛПЭ; оценить динамику влияния изменений клинико-лабораторных показателей, нарушения микробиоценоза и ЛПЭ у больных ХГ.

Материалы и методы. Обследовано 140 больных ХГ, средний возраст $38,2 \pm 4,21$ года. Соотношение мужчин и женщин: 46,4% и 53,6% соответственно.

Диагноз ХГ подтверждался жалобами, анамнезом заболевания и жизни, данными объективного осмотра, результатами лабораторно-инструментальных, морфологических методов исследования. По этиологическому фактору количество пациентов ХГ разных нозологических форм было сопоставимо: хронический алкогольный гепатит (ХАлГ) — 35 (25%) человек, хронический вирусный гепатит В или С (ХВГ) — 35 (25%), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) — 40 (29%) и с аутоиммунным гепатитом (АИГ) — 30 (21%) обследуемых. Стадия ЛПЭ у больных ХГ определялась на основании: анализа жалоб пациентов, психометрического тестирования, оценки когнитивных функций, частотному анализу ЭЭГ, консультации невролога, психиатра, оценки симптомов: тремор пальцев рук, парестезии конечностей, изменение почерка и др. Степень дисбиоза кишечника диагностировалась по «Протоколу ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003), Приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации № 231 от 09.06.2003 г.

Обследованные в зависимости от наличия и стадии выраженности ПЭ распределены на 2 группы:

- группа 1 (сравнения) — 60 (43%) больных ХГ без признаков ПЭ (ПЭ-0);
- группа 2 (основная) — 80 (57%) больных ХГ с латентной ПЭ (ЛПЭ).

В качестве контроля обследовано 30 практически здоровых добровольцев, возраст — $27,8 \pm 1,82$ лет.

Общеклиническое, бактериологическое и лабораторные исследования проводились по общепринятым стандартам. В биохимическое исследование входило определение общего белка и фракций, билирубина, АЛТ, АСТ, ГГТП, ЩФ, протромбинового индекса, мочевины, липидо-

грамма. Исследовались иммунологические показатели: IL-1b, IL-8, ЦИК, g-глобулин.

Психологическое обследование для оценки стадии ПЭ включало индивидуальную беседу, расспрос родственников о динамике изменений характера, поведенческих реакций и использование психодиагностических шкал и тестов (тест связи чисел и тест линии). ЭЭГ для подтверждения нарушений функции мозга оценивала частотный диапазон, амплитуду колебаний, зональное распределение колебаний различных диапазонов. Статистическая обработка проводилась с помощью пакета прикладных программ «SPSS 13.0».

Результаты и обсуждение. Клиническими проявлениями у пациентов ХГ с ЛПЭ являлись астеновегетативный синдром (80%), кишечная и желудочная диспепсия (62% и 60%), отличающиеся от аналогичных показателей группы ПЭ-0 (69%, 31%, 21% соответственно), говорящее о снижении детоксикационной функции печени.

Психомоторные нарушения у пациентов ЛПЭ характеризовались изменениями когнитивных функций (40%). Нарушения координации при ЛПЭ установлены у 21% больных. Изменение ритма сна выявлено не было, однако потребность в дневном 1–2-часовом сне выявлена у 31 человека (46%). Выполняя психометрическое тестирование, пациенты с ЛПЭ легко понимали поставленную перед ними задачу, однако время, затраченное на тестирование, превышало пограничный рубеж (ТСЧ <30 с).

Исследование периферической крови выявило, что с развитием ПЭ имело место снижение уровня тромбоцитов ($p < 0,05$), ускорение СОЭ ($p < 0,05$). В биохимических параметрах крови отмечено, что развитие ПЭ у больных ХГ происходит на фоне увеличения их активности. С формированием ЛПЭ установлено повышение показателей цитолитического, холестатического синдрома, печеночно-клеточной недостаточности ($p < 0,05$) и незначительное снижение белково-синтетической функции печени. Нарастание синдрома печеночно-клеточной недостаточности при ЛПЭ, вероятно, является результатом прямого воздействия эндотоксинов на гепатоциты, в результате чего увеличивается продукция белков острой фазы и угнетается печеночный синтез протеинов. У больных ХАлГ и ХВГ, НАСГ установлена наибольшая активность показателей мезенхимально-воспалительного и цитолитического синдромов, у пациентов с АИГ — холестатического синдрома и печеночно-клеточной недостаточности.

Оценка иммунологических параметров крови выявила, что концентрация провоспалительных цитокинов IL-1b, IL-8 ЦИК и g-глобулина у пациентов ХГ при ЛПЭ была выше, чем в группе ПЭ-0. Максимальный уровень IL-1b отмечен в группе пациентов с ХВГ В и АИГ, а IL-8 — у больных с ХАлГ и ХВГ С. Повышение IL-1b, IL-8 ЦИК и g-глобулина у больных ХГ свидетель-

ствуется об активном воспалении печеночной ткани и является отражением системной реакции организма, служит одним из показателей интенсивности иммунного ответа, активности и прогрессирования ХГ: отмечена зависимость концентрации IL-8 и билирубина ($r = 0,36$, $p < 0,05$), ускорение СОЭ ($r = 0,34$, $p < 0,05$), обратная связь с количеством альбуминов ($r = -0,47$, $p < 0,01$). Концентрация IL-1b коррелировала с уровнем тромбоцитов ($r = -0,44$, $p < 0,05$).

Специфические изменения на ЭЭГ при ЛПЭ определялись только у 35% пациентов, на фоне полиморфной дизритмии определялся деформированный α -ритм с частотой 8,5–12 колебаний в 1 с, что говорит в пользу того, что в диагностике ЛПЭ проведение ЭЭГ имеет лишь вспомогательное значение.

В результате исследования кишечного микробиоценоза получены данные, выявившие нарушения дисбиоза толстой кишки у 97% больных ХГ. У пациентов с отсутствием проявления ПЭ диагностировался дисбиоз I степени – 58%, у 3 пациентов (5%) изменений микрофлоры толстой кишки выявлено не было. У всех пациентов (100%) с ЛПЭ отмечены изменения микробиоценоза толстой кишки. У пациентов с ЛПЭ одинаково наблюдается дисбиоз I степени – 46% и II степени – 44%. Выявлена корреляционная зависимость влияния степени дисбиоза на развития ЛПЭ ($r = 0,44$, $p < 0,01$). У пациентов ХГ с ПЭ-0 отмечается снижение уровня Lactobacillus, общего количества E. coli и возрастает количество S. aureus и условно-патогенных бактерий (Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Morganella, Citrobacter и др.) ($p < 0,05$). При ЛПЭ отмечается появление роста гемолитических E. coli (особенно в группах пациентов ХрАлкГ и НАСГ) и грибов рода Candida (в большей степени у па-

циентов ХрВГ) ($p < 0,05$), отмечается снижение уровня Lactobacillus ($p < 0,05$); повышенный рост S. aureus и других условно-патогенных бактерий остается на прежнем уровне, как в группе ПЭ-0 – рост их числа был в 6 раз выше по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$) (табл.).

В исследовании выявлена прямая связь развития дисбиоза толстой кишки и времени выполнения психометрических тестов – повышенным числом гемолитических E. coli и временем выполнения ТСЧ и ТЛ ($r = 0,31$, $p < 0,05$ и $r = 0,31$, $p < 0,05$), ростом грибов рода Candida ($r = 0,38$, $p < 0,05$ и $r = 0,33$, $p < 0,05$), S. aureus ($r = 0,24$, $p < 0,05$ и $r = 0,24$, $p < 0,05$) и обратная связь: между снижением уровня Lactobacillus и временем ТСЧ и ТЛ ($r = -0,31$, $p < 0,05$ и $r = -0,32$, $p < 0,05$). Учитывая, что в нашем исследовании не было выявлено пациентов ХГ с ЛПЭ с нормальным микробиоценозом толстой кишки, можно предположить, что развитие дисбиоза толстой кишки предшествовало развитию ЛПЭ. Полученные данные свидетельствуют о том, что дисбиоз толстой кишки является триггерным фактором развития ЛПЭ. Таким образом, именно формирование дисбиоза толстой кишки, приводящее к увеличению образования эндогенных нейротоксинов, является одним из триггерных факторов развития и прогрессирования ЛПЭ.

Получены корреляционные связи между содержанием различных групп микроорганизмов в толстой кишке у больных ХГ с ЛПЭ. Отмечена положительная корреляционная связь между концентрацией Bifidobacterium ($p < 0,05$) и Lactobacillus ($p < 0,05$), что может быть обусловлено наличием общих механизмов регуляции их численности. Общее количество E. coli при ЛПЭ по сравнению с ПЭ-0 сохранялось за счет увеличивающегося числа E. coli со сниженной

Характер изменения микробиоценоза толстой кишки пациентов хроническими гепатитами с печеночной энцефалопатией, ($M \pm m$)

Микроорганизмы LgKOE/г	Группа контроля	Стадии ПЭ	
		ПЭ-0	ЛПЭ
Bifidobacterium	8,51 \pm 0,12	8,47 \pm 0,20	8,49 \pm 0,15
Lactobacillus	7,49 \pm 0,25	6,36 \pm 0,13 [к]	5,83 \pm 0,13 [к,0]
Clostridium	2,06 \pm 0,42	2,15 \pm 0,32	2,86 \pm 0,36
Общее количество E. coli	7,11 \pm 0,13	6,46 \pm 0,24 [к]	6,55 \pm 0,18
E. coli со сниженной ферментативной активностью	3,07 \pm 0,58	3,72 \pm 0,71	4,78 \pm 0,54 [к]
Гемолитические микроорганизмы (E. coli)	0 \pm 0	0 \pm 0	0,17 \pm 0,08 [к,0]
Другие условно-патогенные бактерии*	0,21 \pm 0,12	1,29 \pm 0,31 [к]	1,56 \pm 0,26 [к]
S. aureus	0 \pm 0	0,35 \pm 0,12 [к]	0,30 \pm 0,07 [к]
Другие грибы рода Candida	0,10 \pm 0,05	0,13 \pm 0,03	0,89 \pm 0,13 [к,0]

* – представители родов Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Morganella, Citrobacter и др.;

к – различия статистически достоверны ($p < 0,05$) в сравнении с показателями группы контроля;

0 – различия статистически достоверны ($p < 0,05$) в сравнении с показателями группы ПЭ-0;

л – различия статистически достоверны ($p < 0,05$) в сравнении с показателями группы ЛПЭ.

ферментативной активностью ($r = 0,55$, $p < 0,01$). Возрастающая численность грибов рода *Candida* и *S. aureus* ЛПЭ напрямую коррелировала с увеличивающимся количеством условно-патогенных бактерий ($r = 0,51$, $p < 0,05$), что обусловлено наличием единых механизмов, их численностью и факторами колонизации толстой кишки. Рост гемолитических *E. coli* и других условно-патогенных микроорганизмов при ЛПЭ был связан с проявлением астеновегетативного синдрома ($r = 0,33$ и $r = 0,43$; $p < 0,05$), снижение роста *Lactobacillus* и рост числа грибов рода *Candida* ассоциировались с проявлением синдрома кишечной диспепсии ($r = -0,49$, и $r = 0,36$; $p < 0,05$). Отмечена прямая зависимость нарушений кишечной микробиоты с клиническими проявлениями холестатического синдрома (зуд, иктеричность склер и кожи, потемнение мочи). По мере прогрессирования дисбиоза встречаемость указанного синдрома значительно возрастала. Анализируя взаимозависимости между содержанием групп микроорганизмов в толстой кишке и лабораторными данными у больных ХЗП с ЛПЭ были выявлены особенности: установлена прямая связь активности АЛТ с увеличенным ростом гемолитических *E. coli* ($p < 0,05$). Активность АСТ на стадии ЛПЭ была прямо пропорциональна численности *Clostridium* ($p < 0,05$), грибов рода *Candida* ($p < 0,05$) и *E. coli* со сниженной ферментативной активностью ($p < 0,05$). При ЛПЭ достоверного повышения уровня билирубина по сравнению с ПЭ-0 не отмечалось и достоверных связей с изменением микроорганизмов не выявлено. Активность ЩФ и ГГТП коррелировали только у группы 1 (ПЭ-0) с увеличением содержания *Clostridium* ($p < 0,05$), и отмечена прямая связь ГГТП и *E. coli* со сниженной ферментативной активностью ($p < 0,05$). Снижение белково-синтетической функции печени (уменьшение уровня общего белка и альбуминов) на стадии ЛПЭ коррелировала с повышенным ростом *S. aureus* и снижением количества *Bifidobacterium* ($p < 0,01$). Отмечена достоверная обратная связь между содержанием тромбоцитов, снижающихся при ЛПЭ, и числом *E. coli* со сниженной ферментативной активностью ($p < 0,05$), *S. aureus* ($p < 0,05$), *Clostridium* ($p < 0,05$) и условно-патогенными бактериями ($p < 0,05$). Ускорение СОЭ напрямую коррелировало со снижением *Lactobacillus* ($p < 0,05$) и увеличением количества условно-патогенных бактерий ($p < 0,05$). Эти изменения крови у больных ХГ с дисбиозом толстой кишки свидетельствуют, что на его фоне происходит усугубление нарушений функций печени, также дисбиоз способствует развитию более тяжелого состояния больных ХГ и развитию ЛПЭ.

Для оценки клинических особенностей течения ЛПЭ у больных ХГ использована шкала качества жизни SF-36, которая установила, что прогрессирование нервно-психической симптоматики сопровождаются закономерным регрессом показателей КЖ ($p < 0,05$). Наибольшее

снижение всех параметров КЖ наблюдалось у пациентов с ЛПЭ с дисбиозом толстой кишки III степени. Более выраженное снижение показателей было выявлено по шкалам VT — жизнеспособности и GH — общего состояния здоровья, отражая негативную оценку как состояния здоровья на данный момент, так и перспектив на выздоровление. Полученные результаты подтверждают, что ЛПЭ у больных ХГ является ведущим фактором ограничения трудоспособности и основной причиной преждевременного прекращения трудовой деятельности. Таким образом, церебральная дисфункция является важным детерминантом влияния болезни на жизненную активность пациентов и их КЖ.

Выводы

1. У всех больных ХГ с ЛПЭ выявлены нарушения микрофлоры толстой кишки характерные для дисбактериоза I и II степени, характеризующиеся снижением роста *Lactobacillus*, повышением числа *E. coli* со сниженной ферментативной активностью, *S. aureus*, гемолитических *E. coli* и условно-патогенных микроорганизмов, грибов рода *Candida*.

2. У больных ХГ выявлена прямая корреляционная связь между показателями синдромов цитолиза, холестаза, печеночно-клеточной недостаточности, дисбиоза толстой кишки с развитием ЛПЭ.

3. Дисбиоз толстой кишки у больных ХГ является триггерным фактором развития ЛПЭ. Степень дисбиоза напрямую коррелирует со временем выполнения тестов связи чисел и линии, проявлением астеновегетативного синдрома, кишечной диспепсии, цитолиза, холестаза, печеночно-клеточной недостаточности.

4. Формирование ЛПЭ у пациентов ХГ сопровождается ухудшением качества жизни: за счет снижения социальной активности пациентов и физического компонента здоровья.

Литература

1. Буевров А.О. Лечение циррозов печени. Печеночная энцефалопатия: клинические варианты и терапевтические возможности / А.О. Буевров, В.Т. Ивашкин. — М.: Solvay Pharma., 2003. — С. 2–16.
2. Заболевания печени и печеночная энцефалопатия: сател. симпозиум. Мерц, Германия // Рус. мед. журнал. — 2001. — № 12. — С. 3–16.
3. Надинская М.Ю. Латентная печеночная энцефалопатия: как помочь пациенту / М.Ю. Надинская // Клинич. перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. — 2001. — № 1. — С. 10–17.
4. Надинская М.Ю. Лечение печеночной энцефалопатии у больных циррозом печени с позиции доказательной медицины: мифы и реальность / М.Ю. Надинская // Гастроэнтерология, Consilium medicum. — 2006. — № 1, приложение. — С. 17–28.
5. Наместников Е.В. Печеночная энцефалопатия при хронических заболеваниях печени:

лечение и профилактика / Е.В. Наместников, Т.Н. Лопаткина. — М., 2004. — С. 17.

6. Радченко В.Г. Клинические аспекты диагностики и лечения дисбиоза кишечника у больных хроническими заболеваниями печени / В.Г. Радченко [и др.]. — СПб.: СПбГМА, 2009. — 24 с.

7. Ткаченко Е.И. Дисбиоз кишечника / Е.И. Ткаченко, А.Н. Суворов. — СПб.: СпецЛит, 2007. — 356 с.

8. Шерлок Ш. Заболевания печени и желчных путей / Ш. Шерлок, Дж. Дули; пер. с англ.;

под ред. З. Д. Апросиной, Н.А. Мухина. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2002. — С. 100–119.

9. Шульпекова Ю.О. Возможности коррекции метаболических нарушений при печеночной энцефалопатии / Ю.О. Шульпекова, В.Т. Ивашкин // Русский медицинский журнал. — 2005. — Т. 7, № 2. — С. 77–81.

10. Herber T. Hepatic encephalopathy in liver cirrhosis. Pathogenesis diagnosis and management / T. Herber, H. Schomerus // Drugs. — 2000. — V. 60, № 6. — P. 1353–1370.

УДК 614.2:616-001:579.861.2

© Коллектив авторов, 2012

ПОДХОДЫ К СЛЕЖЕНИЮ ЗА МЕТИЦИЛЛИН-РЕЗИСТЕНТНЫМИ ЗОЛОТИСТЫМИ СТАФИЛОКОККАМИ В ТРАВМАТОЛОГИЧЕСКОМ СТАЦИОНАРЕ

APPROACHES TO MONITORING OF METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN TRAUMA HOSPITAL

В.Ю. Хорошилов, Л.П. Зуева, Б.И. Асланов, А.Е. Гончаров

V.Yu. Khoroshilov, L.P. Zueva, B.I. Aslanov, A.E. Goncharov

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург,
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg

Контакт: В.Ю. Хорошилов, e-mail: epid@live.ru

Для оценки формирования госпитальных штаммов золотистого стафилококка в травматологическом стационаре требуются современные методы эпидемиологического надзора, такие как слежение за генетической структурой госпитальной популяции.

Ключевые слова: стафилококки, MRSA, энтеротоксины, гнойная остеология.

Assessment of formation of Staphylococcus aureus hospital strains in trauma facilities requires sophisticated epidemiological surveillance, such as monitoring the genetic structure of Staphylococcus aureus hospital population.

Key words: staphylococcus, MRSA, enterotoxins, trauma hospital.

Введение. Стафилококки являются частыми возбудителями инфекций в стационарах травматологического профиля, ориентированных на лечение больных с гнойной инфекцией. Инфицирование ими ран значительно отягощает течение заболевания, принимающего характер упорного, длительного и трудно поддающегося лечению патологического процесса. Знание механизмов возникновения гнойно-септической инфекции (ГСИ) стафилококковой этиологии имеет определенное эпидемиологическое значение при разработке дополнительных мер инфекционного контроля в травматологическом стационаре.

Известно, что причиной высокой патогенности стафилококка считают его способность вырабатывать пирогенные токсины с суперантигенными свойствами (PTSAgs), что является одним из факторов возникновения ГСИ данной этиологии. В результате такой индукции происходит стимуляция иммунных клеток с продук-

цией большого количества провоспалительных цитокинов, что ведет к развитию заболевания. Определение наличия генов PTSAgs позволяет дать эпидемиологическую характеристику и выявить патогенный потенциал отдельных штаммов *S. aureus*.

Цель исследования — усовершенствование системы эпидемиологического наблюдения за госпитальными штаммами золотистого стафилококка, основанного на применении различных методов внутривидового типирования.

Для выполнения цели исследования были поставлены следующие задачи:

1. Выявить эпидемиологические особенности внутрибольничных инфекций, обусловленных золотистым стафилококком, в травматологическом стационаре.

2. На основании комплекса генотипических методов внутривидового типирования оценить возможность формирования госпитальных штаммов.

3. Установить распространенность генов факторов патогенности, относящихся к суперантигенам в госпитальной популяции золотистого стафилококка.

Материалы и методы. Было изучено 847 клинических образцов от 430 пациентов отделения гнойной остеологии. В исследование были включены 33 штамма метициллин-резистентных золотистых стафилококков (MRSA), выделенных от пациентов с клиническими проявлениями остеомиелита. Все выделенные ДНК подвергались генетическому типированию методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с оригинальными праймерами по наличию/отсутствию генов следующих факторов патогенности (суперантигенов): энтеротоксины А, В, С (sea, seb, sec), лейкоцидин Пантона — Валентайна (pvl), белок токсического шока (tst) по описанным методикам [3, 4]. Эксперименты по типированию MRSA методом пульс-электрофореза и spa-типирование проводили в Шведском институте инфекционного контроля Каролинского университета. Амплификацию варибельного фрагмента гена spa проводили с использованием праймеров, предложенных D. Harmsen [2]. Анализ нуклеотидного состава полученных последовательностей гена spa провели с использованием программы BLAST (<http://www.nih.gov.ncbi>). Результаты секвенирования гена spa обрабатывали, используя веб-сайт <http://www.ridom.de/spaserver/>.

Результаты и обсуждение. Наибольшую долю среди пациентов отделения составили пациенты с хроническими остеомиелитами (73,9%). До поступления в клинику 86% больных с остеомиелитом безуспешно лечились как амбулаторно, так и в различных стационарах, что свидетельствует об упорности заболевания и трудности его лечения.

Результаты микробиологических исследований показали, что золотистый стафилококк занимает первое место в структуре микрофлоры, выделяемой из патологических очагов у больных с остеомиелитами (46,48%), при этом метициллин-резистентные штаммы составили 48%.

Отделение гнойной остеологии характеризуется поступлением в клинику пациентов, уже имеющих ГСИ. В связи с этим частота заносов преобладала над частотой ВБИ и составила 89,3 на 100 пациентов, а частота ВБИ — 10,7 на 100 пациентов. При анализе динамики ВБИ и заносов обращает на себя внимание, что частота внутрибольничного инфицирования не во всех случаях определяется частотой заносов возбудителя в стационар, поскольку отсутствует прочная корреляционная связь между этими показателями. Однако подъемы заболеваемости внутрибольничными инфекциями совпадали по времени или следовали сразу за увеличением частоты заносов возбудителя в стационар.

В ходе исследования обнаружилась корреляционная связь между заболеваемостью ВБИ и контаминированностью объектов внешней

среды стационара (коэффициент корреляции 0,759). Наиболее часто золотистый стафилококк обнаруживался на поверхностях объектов внешней среды гнойной перевязочной, кроме того, высокой была контаминированность рук медицинского персонала.

Было установлено, что 5 изолятов MRSA представляют единый клон, отнесенный по результатам сиквенс-типирования к типу t008 (11-19-12-21-17-34-24-34-22-25), и имеют сходный пульс-электротип (рис.).



Результат типирования методом пульс-электрофореза 5 изолятов *S. aureus*

Обращает на себя внимание, что культуры, отнесенные к данному клону, имели различные профили устойчивости к антибиотикам (табл. 1).

При данных обстоятельствах использование традиционного микробиологического мониторинга, включающего оценку антибиотикограмм, оказалось недостаточно информативным.

Для дифференциации штаммов *S. aureus* была проведена амплификация генов, детерминирующих синтез энтеротоксинов А, В, С, лейкоцидина и токсина синдрома токсического шока. Частота обнаружения отдельных генов среди золотистых стафилококков, циркулирующих в травматологическом стационаре, приведена в таблице 2.

Установлено, что доля штаммов *S. aureus*, имеющих в составе ДНК гены факторов патогенности, относящихся к суперантигенам, составила около 90%. Этот процент превышает соответствующую долю суперантиген-позитивных культур среди негоспитальных штаммов золотистого стафилококка, которая колеблется от 20 до 40% в различных выборках негоспитальных культур [1].

Таблица 1

Профили устойчивости к антибиотикам и генотипическая характеристика пяти изученных изолятов MRSA

Штамм	Дата	Антибиотикограмма, MIC						Генотипическая характеристика		
		FX	CM	GM	VA	CI	FU	pvl-ген	spa-тип	число повторов в гене spa
2	2007	R	S	I	S	R	S	—	t008	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25
194	2008	R	S	R	S	R	S	—	t008	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25
355	2008	R	S	R	S	R	S	—	t008	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25
407	2008	R	R	S	S	R	S	—	t008	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25
417	2008	R	S	R	S	R	S	—	t008	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25

FX — цефокситин, CM — клиндамицин, GM — гентамицин, VA — ванкомицин, CI — ципрофлоксацин, FU — фузидин.

Таблица 2

Частота обнаружения отдельных генов среди золотистых стафилококков

sea	seb	sec	pvl	tst
48,48	0	42,42	0	0

Таким образом, мы полагаем, что штаммы, циркулирующие в травматологическом стационаре, обладают высоким патогенным потенциалом. Эпидемиологическое наблюдение в подобном типе стационаров, должно включать в себя элементы слежения за штаммами, несущими указанные гены факторов патогенности.

Выводы

1. К эпидемиологическим особенностям изучаемого стационара относится высокая частота заносов инфекции, наряду с высокой вероятностью реализации внутрибольничного инфицирования.

2. Выявленные эпидемиологические особенности, наряду с особенностями клинического течения заболевания, которое предполагает многократные госпитализации пациентов в травматологические стационары, создают предпосылки для формирования в отделениях гнойной остеологии госпитальных штаммов возбудителей.

3. Для оценки формирования госпитальных штаммов золотистого стафилококка в травматологическом стационаре требуется внедрение современных методов эпидемиологического надзора, таких как слежение за генетической структурой госпитальной популяции возбудителя.

Литература

1. Дмитриенко О.А. Определение генов пирогенных токсинов суперантигенов у клинических изолятов метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* / О.А. Дмитриенко [и др.] // Журн. микробиол. — 2006. — № 2. — С. 36–42.
2. Harmsen D. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management / D. Harmsen [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2003. — № 41. — P. 5442–5448.
3. Lina G. Involvement of Panton–Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia / G. Lina [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 1999. — № 29. — P. 1128–1132.
4. Mehrotra M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin, and methicillin resistance / M. Mehrotra, G. Wang, W.M. Johnson // J. Clin. Microbiol. — 2000. — № 38 (3). — P. 1032–1035.