

6. Требования СанПиН 2.4.1.2660-10. Приложение 6. 2010.

Requirements of SanPiN 2.4.1.2660-10, addendum 6/2010.

7. Тутельян В.А. Руководство по детскому питанию / В.А. Тутельян, И.Я. Конь. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 662 с.

Tutelyan V.A. The guide on a child diet/ V.A.

Tutelyan, I.Y. Kon. – M.: Medical information agency, 2004. – 662 p.

8. Хавова Л.А. Состояние зрительного анализатора в комплексной оценке здоровья детей : дис... канд. мед наук.: 14.00.08 / Хавова Лидия Александровна. – Смоленск, 2008. – С. 19-23.

Khavova L.A. State of visual analyzer in a complex estimate of children's health: dis.,

cand. of med.sci.: 14.00.08/ Khavova Lidiya Alexandrovna. – Smolensk, 2008. – p. 19-23.

9. Химический состав российских пищевых продуктов: справочник / под ред. И.М. Скурихина, В.А. Тутельяна. – М., 2002. – 236 с.

Skurikhin I.M. Chemical content of the Russian nutrients: Reference book/ under ed. of I.M. Skurikhin, V.A. Tutelyan. – M., 2002. – 236 p.

С.Х. Шамаева, Е.Ю. Скленова, М.В. Эйдельштейн, В.Н. Маркова, Н.Н. Свешникова, К.М. Петрова, А.Ф. Потапов, У.С. Портнягина, А.С. Матвеев, Т.С. Макарова, Н.М. Гоголев, А.А. Кузьмина, Н.А. Варфоломеева, И.Ш. Малогулова

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ШТАММОВ *P. AERUGINOSA* В МНОГОПРОФИЛЬНОМ СТАЦИОНАРЕ

УДК 515.33:573.4(571.56)

Представлены результаты молекулярно-генетического типирования и изучения устойчивости к антибактериальным препаратам нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из клинического материала больных в период 2010-2011 гг. Выявлено клональное распространение полирезистентного (XDR) металло-β-лактамазопродуцирующего штамма *P.aeruginosa* ST235 (VIM-2).

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, нозокомиальные инфекции, антибиотикорезистентность, чувствительность к антибактериальным препаратам, металло-β-лактамаза.

The article presents the results of molecular genetic typing and studying of resistance to antibiotics of *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial strains, isolated from the clinical samples of the patients in period of 2010-2011. Clonal spread of multidrug-resistant (XDR) metal-beta-lactamase-producing *P.aeruginosa* strains ST235 (VIM-2) were revealed.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, nosocomial infections, antimicrobial resistance, sensitivity to antibiotics, metal-β-lactamase.

Введение. Нозокомиальные инфекции представляют серьезную проблему в современной медицине и оказывают существенное влияние на прогноз и исходы заболеваний. Одним из наиболее

серьезных возбудителей внутрибольничной инфекции, осложняющей течение многих гнойно-воспалительных заболеваний, является *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*). К особенностям этого микроорганизма относятся быстрое формирование и высокий уровень устойчивости ко многим антибактериальным препаратам широкого спектра, которые обычно назначают для эмпирической терапии нозокомиальных инфекций [2].

Для *P.aeruginosa* характерны различные механизмы устойчивости – снижение проницаемости клеточной стенки для антибиотиков (снижение экспрессии поринового белка OprD), активное выведение антибиотика из клетки (активация систем эффлюкса), продукция отдельных сериновых β-лактамаз, обладающих карбапенемазной активностью. Однако наибольшее клиническое и эпидемиологическое значение имеет продукция приобретённых металло-β-лактамаз (МβЛ). Металло-β-лактамазы IMP и VIM гидролизуют практически все β-лактамы, включая карбапенемы, за исключением азтреонама.

Поэтому эффективное лечение инфекций, вызванных *P.aeruginosa*, остается сложной клинической проблемой и требует адекватного микробиологического контроля и обязательного изучения их чувствительности in vitro [3].

Цель исследования – определение уровней устойчивости к антибактериальным препаратам, определение распространённости металло-β-лактамаз и генетическое типирование штаммов *P.aeruginosa*, выделенных у больных многопрофильного стационара.

Материалы и методы исследования. Исследовано 662 изолята *P. aeruginosa*, выделенных из клинического материала пациентов отделений экстренной хирургии (ЭХО) и гнойной хирургии (ОГХ), отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), отделения термической травмы (ОТТ), отделения неотложной терапии (ОНТ), отделения для больных с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК), ОРИТ для больных с ОНМК, нейрохирургического отделения (НХО) ГБУ Республики Саха (Якутия) «Республиканская больница №2 – Центр

ГБУ РС(Я) «РБ№2-ЦЭМП»: **ШАМАЕВА С.Х.** – к.б.н., зав. лаб., stevas@mail.ru, **МАРКОВА В.Н.** – врач-бактериолог, valmark2010@yandex.ru, **СВЕШНИКОВА Н.Н.** – врач-бактериолог, **ПЕТРОВА К.М.** – врач-бактериолог, **ПОРТНЯГИНА У.С.** – к.м.н., доцент ИГОВ СВФУ, клинический фармаколог, ulyana-nsk@mail.ru, **МАТВЕЕВ А.С.** – к.м.н., врач-анестезиолог, **МАКАРОВА Т.С.** – к.м.н., зав. отделением, mtc712@mail.ru; НИИ антимикробной химиотерапии ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» МЗ и СР РФ: **СКЛЕЕНОВА Е.Ю.** – к.м.н., н.с., **ЭЙДЕЛЬШТЕЙН М.В.** – д.м.н., зав. лаб.; СВФУ им. М.К. Аммосова: **ПОТАПОВ А.Ф.** – д.м.н., зав. кафедрой, potapov-paf@mail.ru, **ГОГОЛЕВ Н.М.** – к.м.н., доцент, зав. кафедрой ИГОВ, gogrcemp@rambler.ru, **КУЗЬМИНА А.А.** – к.ф.н., доцент, зав. кафедрой МИ, **ВАРФОЛОМЕЕВА Н.А.** – к.м.н., доцент МИ, nadena.var@mail.ru, **МАЛОГУЛОВА И.Ш.** – к.б.н., доцент МИ.

экстренной медицинской помощи» (РБ №2-ЦЭМП), за период 2010-2011 гг.

Выполнена идентификация и реидентификация штаммов по общепринятым методикам согласно нормативным документам, регламентирующим работу бактериологических лабораторий, а также использовались биохимический микротест НЕФЕРМтест24 (MICROLATEST), тест-системы API (bioMérieux, Франция).

Исследование проводилось в рамках проекта «Национальная программа мониторинга распространения штаммов грамотрицательных микроорганизмов, продуцирующих металло-β-лактамазы в России (МЕТАЛЛ)» совместно с НИИ антимикробной химиотерапии (НИИАХ) ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России и Межрегиональной ассоциацией по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), с Научно-методическим центром антимикробной резистентности (ЦМАР).

Определена чувствительность к 15 антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом на среде Мюллера-Хинтон в соответствии с МУК 4.2.1890-04. Контроль качества проводили с использованием контрольных штаммов *P.aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922. Интерпретацию результатов проводили в соответствии с рекомендациями и критериями CLSI/NCCLS (2010-2011).

Для всех карбапенемрезистентных штаммов выполнен фенотипический скрининг продукции металло-β-лактамаз (МβЛ) методом двойных дисков с ЭДТА [4].

Для обнаружения генов МβЛ VIM и IMP типов использована мультиплексная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (28 полирезистентных клинических изолятов *P.aeruginosa*).

Идентификация амплификационных фрагментов *bla_{VIM}* и *bla_{IMP}* генов проводилась путем определения температур их плавления (~80°C для *bla_{IMP}* и ~85°C для *bla_{VIM}*) в присутствии интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I. Дополнительно сравнивались кривые плавления опытных образцов с кривыми плавления позитивных контрольных штаммов.

Для оценки структуры интегров, несущих гены МβЛ, использован метод ПДРФ (англ. RFLP, полиморфизм длины рестрикционных фрагментов). Вариабельные участки интегров I класса амплифицированы с помощью праймеров к 5'(intI1) и 3'(qacE=1 или

tniC/Tn5090) консервативным последовательностям интегров в парах с внутренними праймерами к генам *bla_{VIM}* и подвергнуты рестрикции эндонуклеазой TaqI. Полученные рестрикционные профили ПЦР фрагментов сопоставлены с соответствующими профилями известных МβЛ-кодирующих интегров, использованных в качестве контролей.

Выполнено эпидемиологическое типирование карбапенемрезистентных изолятов *P.aeruginosa*, с использованием мультилокусного анализа tandemных повторов (multiple-locus variable number tandem repeat analysis, MLVA). Проведена оценка количества tandemных повторов в шести VNTR-локусах (VNTR – Variable Number Tandem Repeat, tandemные повторы с переменным числом звеньев). Амплификация шести VNTR-локусов выполнена с помощью мультиплексной ПЦР (по 2 отдельные реакции для каждого изолята). Анализ размеров продуктов амплификации шести VNTR-локусов выполнен методом капиллярного электрофореза с флуоресцентной детекцией (фрагментный анализ) на автоматическом секвенаторе ABI-310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Кластерный анализ MLVA профилей проведен с помощью программного пакета Bionumerics v.6.6 (Applied Maths) с использованием категориальных значений длин VNTR локусов и алгоритма построения дендрограмм минимальных дистанций (Minimum Spanning Tree) [4].

Ввод, статистическая обработка и анализ данных производился с помощью компьютерной программы Microsoft Excel (версия 7.0. для Windows 2000) и программного обеспечения WHONET 5.6.

Результаты и обсуждение.

Среди исследованных штаммов наибольшее количество *P.aeruginosa* 42,8% (283 изолята) было выделено у больных, находившихся на лечении в ожоговом отделении. Удельный вес идентифицированных штаммов *P.aeruginosa* в других отделениях стационара составил: ОПИТ – 24,4% (162), ОГХ – 15,5(102), НХО

– 8,1(54), ЭХО – 2,9(19), ОПИТ для больных с ОНМК – 2,4 (16), отделения для больных с ОНМК – 2,2(15) и ОНТ – 1,7%(11).

Наиболее часто клинические изоляты *P.aeruginosa* (n=662) выделялись из раневого отделяемого – 428(64,6%), далее в убывающем порядке: из трахеального аспирата – 91(13,8), смывных вод бронхов (СВБ) – 81(12,2), мокроты – 42(6,4), плевральной жидкости – 20(3%) (рис.1).

Из 662 исследованных штаммов с помощью метода «двойных дисков с ЭДТА» продукция МβЛ выявлена у 223 (33,6%) карбапенемрезистентных штаммов *P.aeruginosa* из 7 различных отделений РБ №2-ЦЭМП.

На следующем этапе работы мы провели молекулярно-генетическое исследование 28 карбапенемрезистентных штаммов *P.aeruginosa*. У всех 28 изолятов по данным ПЦР анализа подтверждено наличие МβЛ VIM типа.

Методом ПДРФ (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов) установлена идентичность структуры интегров, несущих ген МβЛ у данных изолятов, и VIM-2-кодирующего интегона с набором генетических кассет *aacA7-bla_{VIM}-2-dhfrB5-aacC-A5* (GenBank Acc. No. DQ52233) (рис.2), ранее описанного у штаммов *P.aeruginosa* из США [6], России [7] и Норвегии [8].

Типирование *P.aeruginosa* с помощью анализа множественных tandemных повторов (MLVA) выявило, что все 28 МβЛ – позитивные штаммы *P.aeruginosa* являются родственными и принадлежат к единому клональному комплексу (CC235) (рис.3). Этот распространенный сиквент-тип 235

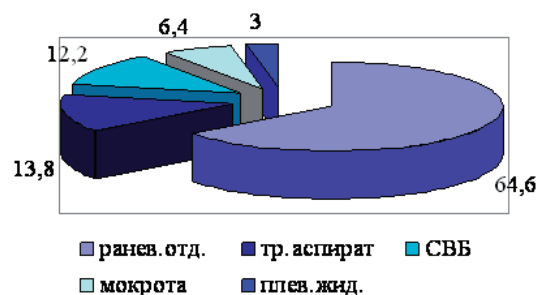


Рис.1. Удельный вес клинического материала, из которого выделены изоляты *P.aeruginosa* (%)



Рис.2. Структура VIM-2-кодирующего интегона у изолятов *P.aeruginosa*

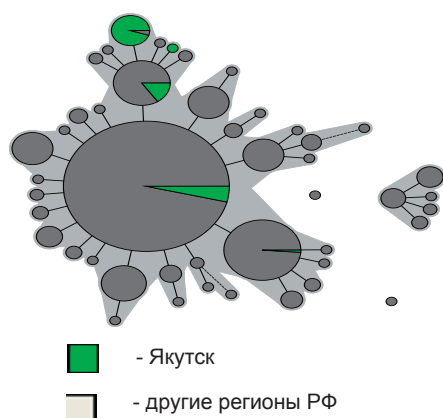


Рис.3. Клональность штаммов *P. aeruginosa* на основании MLVA типирования

(ST235) является эпидемическим и в настоящее время выявлен в стационарах 27 городов РФ, Беларуси и Казахстана («Национальная программа мониторинга распространения штаммов грамотрицательных микроорганизмов, продуцирующих металло-β-лактамазы в России (МЕТАЛЛ)»).

Определение чувствительности МБЛ-продуцирующих изолятов *P. aeruginosa* показало, что выделенные штаммы отличаются высокими уровнями устойчивости (100%) ко всем протестированным антибактериальным препаратам: пиперациллину, пиперацillin-тазобактаму, цефтазидиму, цефепиму, цефоперазон-сульбактаму, азтреонаму, имипенему, меропенему, дорипенему, гентамицину, нетилмицину, амикацину, цiproфлоксацину, левофлоксацину, фосфомицину. Чувствительность изолятов выявлена лишь к колистину и полимиксину В.

Выводы:

1. В условиях многопрофильного стационара Республики Саха (Якутия)

– РБ№2-ЦЭМП имеет место клональное распространение суперрезистентного (XDR) штамма *P. aeruginosa* ST235 (VIM-2).

2. Распространение полирезистентности к антибактериальным препаратам среди изолятов *P. aeruginosa* в клинических подразделениях РБ№2-ЦЭМП обусловлено выявлением у них одного из наиболее распространенных механизмов антибиотикорезистентности, связанных с продукцией металло-β-лактамаз.

3. МБЛ-продуцирующие изоляты *P. aeruginosa* выделяются во всех клинических материалах и практически во всех отделениях многопрофильного стационара Республики Саха (Якутия).

4. Появление полирезистентных МБЛ-продуцирующих штаммов и опасных эпидемических клонов *P. aeruginosa* требует разработки мероприятий инфекционного контроля, направленных на своевременное выявление и ограничение распространения циркуляции МБЛ-продуцирующих изолятов *P. aeruginosa* в подразделения больницы, а также в другие в лечебные учреждения; введения обязательного постоянного мониторинга за антибиотикорезистентностью; эпидемиологического маркирования карбапенемрезистентных изолятов.

Литература

1. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Метод. указания 4.2.1890–04. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора МЗ России, 2004. – 91 с.
Detection of antibiotic sensitivity of the microorganisms: Method. instructions 4.2.1890–04. – М.: Federal Centre of Sanitary Inspection of Ministry of Health of Russia, 2004. – 91 p.

2. Неферментирующие грамотрицательные возбудители нозокомиальных инфекций в ОРИТ России: проблемы антибиотикорезистентности / Г.К. Решедько, Е.Л. Рябкова, А.Н. Фаращук [и др.] // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2006. – 8(3). – С. 243–259.

Non-fermentative gram-negative pathogens of nosocomial infections in resuscitation and intensive care units in Russia: problem of antibiotic resistance / G.K. Reshedko, E.L. Ryabkova, A.N. Faraschuk [et al.] // Clin Microbiol Antimicrob Chemother. – 2006. – 8(3). – P. 243–259.

3. Яковлев С.В. Госпитальные инфекции, вызванные резистентными грамотрицательными микроорганизмами: клиническое значение и современные возможности терапии / С.В. Яковлев // Инфекции и антимикробная терапия. – 2004. – Т. 6. – №4. – С. 16–18.

S.V. Yakovlev. Nosocomial infections caused by resistant Gram-negative bacteria: clinical significance and current treatment options // Infection and antimicrobial therapy. – 2004. – V.6. – №4. – P. 16–18.

4. Эйдельштейн М.В. Методы выявления металло-β-лактамаз у грамотрицательных неферментирующих бактерий / М.В. Эйдельштейн // Методики клинических лабораторных исследований. – М.: Лабора, 2009. – Т.3. – С. 404–411.

M.V. Edelstein. Methods of detection of metal-beta-lactamases in Gram-negative non-fermenting bacteria / M.V. Edelstein // Methods of clinical laboratory tests. – M.: Laboratory, 2009. – V.3. – P. 404–411.

5. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. – Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.

6. De Novo Daptomycin Nonsusceptibility in a Clinical Isolate / K. Lolans [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2005.

7. Efficient and stable transgene suppression via RNAi in field-grown poplars / O. Shevchenko [et al.] // Transgenic Research. – 2008.

8. Primary mechanisms mediating aminoglycoside resistance in the multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7 / Q. Samuelsen [et al.] // Microbiology. – 2010.

Е.Л. Лазуткина, Ю.С. Ландышев, Д.Д. Цырендоржиев ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОЙ ЛАВАЖНОЙ ЖИДКОСТИ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

УДК: 616.248-092.4-07

Изучен клеточный состав, состояние окислительно-метаболической функции и цитокин-продуцирующая активность клеток бронхоальвеолярной (БАЛ) жидкости больных для уточнения механизмов, определяющих тяжесть клинического течения бронхиальной астмы (БА). Установлено увеличение численности нейтрофилов в БАЛ жидкости больных БА по мере усугубления тяжести заболевания. Также установлено, что при этом клетки БАЛ жидкости больных БА секретируют в большей степени цитокины Th2 профиля. Дано обоснование, что эти изменения функционального состояния легочных клеток лежат в основе механизмов, определяющих тяжесть клинического течения БА.

Ключевые слова: бронхиальная астма, бронхоальвеолярный лаваж, нейтрофил, макрофаг, активные кислородные метаболиты, цитокины.

The cellular composition of the oxidation-state of metabolic function and cytokine-producing activity of cells of bronchoalveolar (BAL) fluid of patients to clarify the mechanisms that determine the severity of the clinical course of bronchial asthma (BA) was studied.

ЛАЗУТКИНА Елена Леонидовна – к.м.н., доцент Амурской государственной медицинской академии, amurlaz@mail.ru; **ЛАНДЫШЕВ Юрий Сергеевич** – д.м.н., проф. зав. кафедрой Амурской ГМА; **ЦЫРЕНДОРЖИЕВ Дондок Дамдинович** – д.м.н., проф., вед. н.с. НИИ клинической иммунологии СО РАМН, tsdon@mail.ru.