

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.157-078

Леонов В.В.¹, Миронов А.Ю.³, Леонова Л.В.¹, Никитина Л.Ю.^{1,2}

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ КРОВотоКА

¹БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», Ханты-Мансийск;

²БУ «Окружная клиническая больница», Ханты-Мансийск;

³ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва

*Инфекции кровотока по-прежнему остаются актуальными из-за отсутствия универсальных подходов к их диагностике и высокой летальности. Принимая во внимание то, что наиболее часто сепсисогенные штаммы проходят селекцию в крови, изучение биологических свойств гемокультур в сравнении со штаммами, выделенными из других биотопов, очень важно для понимания механизмов выживания патогенов в крови и прогнозирования развития септических осложнений. В работе представлены результаты микробиологического исследования крови, проведенного в многопрофильной клинике Ханты-Мансийска в период с 2007 по 2015 г. Определялись биологические свойства *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* — гемолитическая (ГА), каталазная (КА), антилизоцимная (АЛА), антикомплемментарная (АКА), биопленкообразующая (БПО) активность гемокультур и штаммов, выделенных из других биотопов. Определение ГА, КА, АЛА, АКА проводили фотометрическим методом по способности лизировать/инактивировать соответствующий субстрат. БПО оценивали по изменению краевого угла смачивания поверхности биопленки. Приоритетными патогенами инфекций кровотока являлись коагулазоположительные стафилококки — 38,3% (*S. aureus*), коагулазоотрицательные стафилококки — 23,4% (*S. epidermidis*, *S. hominis* и др.), энтеробактерии — 12,3% (*E. coli*, *K. pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* — 4,1%; среди грибов — *C. albicans* (2,5%). Показано, что гемокультуры по сравнению со штаммами, выделенными из других биотопов, имеют статистически достоверно более высокие значения КА, АЛА, АКА, БПО. Сделан вывод о значимости этих биологических свойств патогенов для их выживания в крови. Предложено использовать данные показатели в качестве маркеров сепсисогенных штаммов при прогнозировании генерализации инфекционного процесса.*

Ключевые слова: кровь; биопленки; активность каталазы; гемолитическая активность; антилизоцимная активность; антикомплемментарная активность.

Для цитирования: Леонов В.В., Миронов А.Ю., Леонова Л.В., Никитина Л.Ю. Этиологическая структура и биологические свойства возбудителей инфекций кровотока. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (11): 790-793. DOI:10.18821/0869-2084-2016-11-790-793

Leonov V.V.¹, Mironov A.Yu.³, Leonova L.V.¹, Nikitina L.Yu.^{1,2}

THE ETIOLOGIC STRUCTURE AND BIOLOGIC CHARACTERISTICS OF AGENTS OF INFECTIONS OF BLOODSTREAM

¹The Khanti-Mansiiskaya state medical academy, Khanti-Mansiisk, Russia

²The Okrug clinical hospital, Khanti-Mansiisk, Russia

³The G.N. Gabrichevskii Moskovskii research institute of epidemiology and microbiology of Rospotrebnadzor, 125212 Moscow, Russia

*As before, the infections of blood flow remain actual because of absence of universal approaches to their diagnostic and high lethality. Taking into account the fact that most frequently the sepsisogenic strains are selected in blood, studying of biological characteristics of hemocultures in comparison with strains isolated from other biotopes is very important for understanding the mechanisms of survival of pathogens in blood and prognosis development of septic complications. The article presents the results of microbiological analysis of blood carried out in multi-field clinic of Khanti-Mansiisk during 2007-2015. The following biological characteristics of *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *C.albicans*: hemolytic, catalase, anti-lysozyme, anti-complementary, biofilm forming, activity of hemocultures and strains isolated from other biotopes. The detection of hemolytic, catalase, anti-lysozyme, anti-complementary activities was implemented using photo-metric technique by capacity to lyse/inactivate corresponding substrate. The biofilm forming activity was evaluated according alteration of contact angle of moistening of surface of biofilm. The priority pathogens of infections of blood stream are coagulase-positive staphylococci - 38.3% (*S.aureus*), coagulase-negative staphylococci (*S.epidermidis*, *S.hominis* etc.), enterobacteria - 12.3% (*E.coli*, *K.pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* - 4.1%, among fungi - *C.albicans* (2.5%). It is demonstrated that, in comparison with strains isolated from other biotops, hemocultures have statistically reliable higher values of catalase, anti-lysozyme, anti-complementary, biofilm forming activities. The conclusion is made concerning significance of these biological characteristics of pathogens for their survival in blood. It is proposed to use these indices as markers of sepsisogenic strains in prognosis of generalization of inflectional process.*

Key words: blood; biofilm; activity of catalase; hemolytic activity; anti-lysozyme activity; anti-complementary activity.

Для корреспонденции: Миронов Андрей Юрьевич, д-р мед. наук, проф., рук. отдела микробиологии ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, e-mail: andy.60@mail.ru

For citation: Leonov V.V., Mironov A.Yu., Leonova L.V., Nikitina L.Yu. The etiologic structure and biologic characteristics of agents of infections of bloodstream. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (11): 790-793. (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-11-790-793*

For correspondence: Mironov A.Yu., doctor of medical sciences, professor, head of department of microbiology. e-mail: andy.60@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Financing. The study had no sponsor support

Received 25.05.2016
Accepted 15.06.2016

Введение. Ежегодно от инфекций кровотока в мире страдает 1,5 млн человек [1,2]. Сепсис ежегодно диагностируется в США у 750 тыс. человек. Летальность при сепсисе достигает 30—60% и имеет тенденцию к дальнейшему росту [1, 3]. Проблемы терапии септических состояний связаны с отсутствием универсальных подходов к их диагностике, возможности ранней диагностики и прогноза развития септических осложнений. Кроме того, отсутствует специфический возбудитель сепсиса. В последние десятилетия наблюдается рост количества случаев сепсиса, вызванного условно-патогенными микроорганизмами. Кровь содержит антимикробные факторы, под селективным давлением которых изменяются биологические свойства сепсисогенных штаммов. Способность микроорганизмов к транслокации из первичного очага инфекции в кровяное русло зависит как от его биологических свойств, так и от иммунного статуса пациента. Изучение биологических свойств патогенов важно для понимания механизмов их выживания в крови и прогнозирования возможности развития септических осложнений.

Целью работы является изучение этиологической структуры возбудителей инфекций кровотока и их биологических свойств.

Материал и методы. Исследование проведено в лаборатории клинической микробиологии ОКБ Ханты-Мансийска и лаборатории микробиологии, вирусологии, иммунологии Ханты-Мансийской медицинской академии. Исследована кровь пациентов ОКБ с подтвержденным и неподтвержденным клиническим диагнозом «сепсис» за период с 2007 по 2015 г. Гемокультуры выделяли с помощью анализатора гемокультур BacT/ALERT с использованием коммерческих питательных сред (BacT/ALERT SA, BacT/ALERT SN, bioMérieux, Франция). Идентификация микроорганизмов проводилась на автоматическом баканализаторе Walk Away 40 (Dade Bering, США).

Для составления биологических профилей микроорганизмов выбран комплекс факторов патогенности, включающий способность микроорганизмов инактивировать лизоцим — антилизозимная активность (АЛА), белки системы комплемента — антикомплемментарная активность (АКА), способность к биопленкообразованию (БПО), гемолитическая (ГА) и каталазная активность (КА). АЛА определяли по способности инактивировать лизоцим куриного яйца, АКА — по способности гемолизировать сенсibilизированные эритроциты [4,5]. ГА определяли по лизису эритроцитов человека I(0) группы Rh⁺ [6], АК — по способности разрушать перекись водорода [7]. Способность к образованию биопленок определяли по изменению краевого угла смачивания поверхности биопленки с последующим расчетом удельной скорости образования биопленки ($\mu, \text{ч}^{-1}$) [8].

Изучены биологические свойства 20 гемокультур *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* и 20 штаммов микроорганизмов этих же видов, выделенных из фекалий, мокроты и раневого отделяемого больных ОКБ Ханты-Мансийска. Для предотвращения изменения биологических свойств все штаммы хранились на полужидком голодном агаре при температуре +5°C. Статистическую достоверность различий

оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента и *U*-критерия Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение. За период с 2007 по 2015 гг. обследовано более 10 тыс. пациентов, от которых выделено 3860 гемокультур. Положительные пробы составили 21,8%; диагноз сепсиса клинически подтвержден в 18,2% случаев. Среди гемокультур преобладали стафилококки — от 45 до 48,8% в разные годы, энтеробактерии — от 15,8 до 31%; грамотрицательные неферментирующие палочки (НГОБ) — от 4,1 до 5,8%, грибы — от 0,8 до 6,5%.

В этиологии сепсиса удельный вес стафилококков составил 61,7%, энтеробактерий — 13,6%, НГОБ — 6,2%, грибов — 2,5%. Приоритетными патогенами сепсиса являлись коагулазоположительные стафилококки — 38,3% (*S. aureus*), коагулазоотрицательные стафилококки — 23,4% (*S. epidermidis*, *S. hominis* и др.), энтеробактерии — 12,3% (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* — 4,1%. Среди грибов преобладала *Candida albicans*. Полученные данные согласуются как с результатами многоцентрового исследования ESGNI (European Study Group on Nosocomial Infection), так и с работами отечественных авторов [2; 9; 10].

Мониторинг возбудителей сепсиса за 2007—2015 гг. существенных различий не выявил. Отмечалось увеличение удельного веса НГОБ — *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* — и увеличение частоты высеваемости редких возбудителей. В нескольких пробах крови обнаружены и идентифицированы *Alcaligenes faecalis*, *Aeromonas salmonicida*, *Aerococcus viridans*.

Исходя из данных этиологической структуры сепсиса, в многопрофильной клинике для изучения био профиля и сравнительного анализа возбудителей инфекций кровотока нами были выбраны *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*. Несмотря на низкую частоту выделения *C. albicans* из крови, данный патоген представлял интерес из-за своей принадлежности к грибам.

Способность к гемолизу может быть важна для получения микроорганизмами железа из гемоглобина, по наличию ГА можно косвенно судить о вирулентности выделенных культур. АК позволяет патогенам инактивировать перекись водорода и обеспечивает устойчивость к оксидативному стрессу при фагоцитозе.

Все изоляты *P. aeruginosa* обладали способностью к гемолизу эритроцитов и имели достоверные отличия средних значений ГА: 92% для гемокультур и 85% для изолятов из других биотопов ($p < 0,05$). Достоверных отличий в распространенности и выраженности ГА для других микроорганизмов не выявлено. Средние значения ГА составили 65—72% для *S. aureus*, 45—48% для *E. coli*, 2,5—4% для *C. albicans* ($p > 0,05$).

Все изученные штаммы микроорганизмов обладали АК (рис. 1). Гемокультуры обладали высокой АК по сравнению с изолятами из других биотопов. Наиболее высокие значения АК имели штаммы *P. aeruginosa* (от 4,5 до 6,1 ммоль·л⁻¹·мин⁻¹) и *S. aureus* (от 1,9 до 3,2 ммоль·л⁻¹·мин⁻¹).

Биопленка защищает микроорганизмы от действия антимикробных факторов различной природы. Способность патогенов к БПО может иметь очень важное значение для их

МИКРОБИОЛОГИЯ

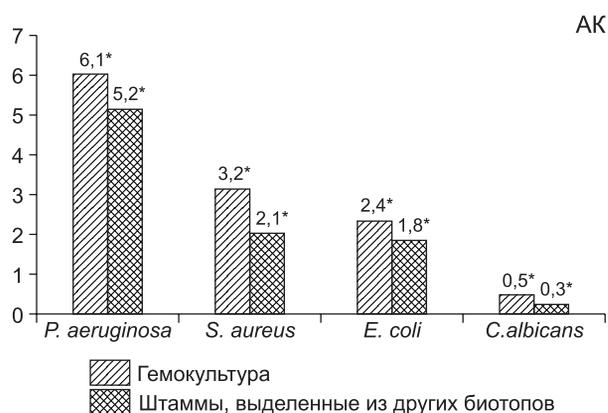


Рис. 1. Выраженность АК у исследуемых штаммов.

выживания в кровотоке — иными словами, ее можно рассматривать как защитный фактор. Способность к образованию биопленки выявлена у всех изученных штаммов. Все исследованные штаммы микроорганизмов имели достоверные отличия по значению μ в зависимости от источника выделения (рис. 2). Гемокультуры имели значения μ в 1,2—1,5 раза выше, чем изоляты из других биотопов ($p < 0,05$). При сравнительной оценке результатов определения штаммы *P. aeruginosa* и *E. coli* всегда имели самые высокие значения μ по сравнению со штаммами *S. aureus* и *C. albicans* независимо от источника их выделения.

Способность инактивировать лизоцим и белки системы комплемента обеспечивает микроорганизмам возможность присутствия в крови. О способности инактивировать данные факторы гуморального иммунитета судят по АЛА и АКА. Результаты определения значений АЛА и АКА для всех изученных культур представлены на рис. 3 и 4. Наиболее высокие значения АЛА и АКА имели гемокультуры, самые высокие значения АЛА характерны для *P. aeruginosa*, АКА — для *E. coli* и *P. aeruginosa*. Средние значения АЛА оказались у штаммов *S. aureus*, выделенных из крови: 4,65 мкг/мл ед. опт. пл.; АКА — у штаммов *P. aeruginosa* и *E. coli*: 3,1 — анти-СН₅₀ и 3,7 анти-СН₅₀ соответственно. У прочих микроорганизмов показатели АКА находились в пределах от 1,1 до 2,7 анти-СН₅₀.

Заключение. Этиологическая структура возбудителей инфекций кровотока в многопрофильной клинике за 2007—2015 гг. не претерпела существенных изменений. Сохраня-

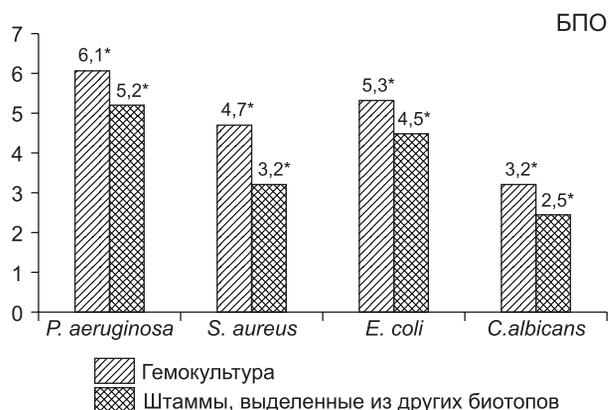


Рис. 2. Значения удельной скорости (μ , ч⁻¹) образования биопленки у исследуемых штаммов в зависимости от источника выделения.

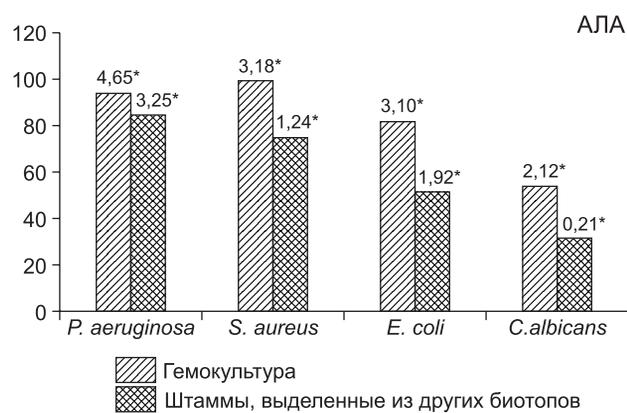


Рис. 3. Распространенность и уровни АЛА у исследуемых штаммов.

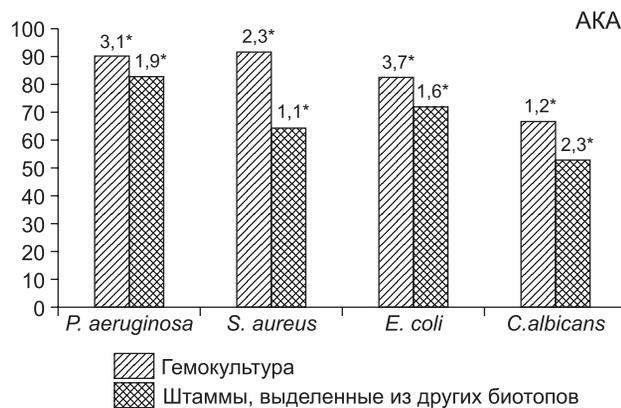


Рис. 4. Распространенность и уровни АКА у исследуемых штаммов.

ется тенденция к увеличению долей НГОБ и *Candida* spp. Среди факторов патогенности возбудителей инфекций кровотока достоверно чаще обнаруживаются высокие значения АК, БПО, АЛА, АКА. Достоверные отличия по выраженности ГА в зависимости от биотопа выделения не обнаружены. Способность инактивировать лизоцим и белки системы комплемента необходима микроорганизмам для выживания в крови. Ранее нами показано, что сыворотка крови стимулирует биопленкообразующую активность микроорганизмов [11], благодаря чему патоген способен защищаться от микробицидных систем крови. АК защищает микроорганизмы от развития оксидативного стресса при фагоцитозе. Биологические свойства возбудителей — в частности, их способность к персистенции, — имеют важное диагностическое значение. Доказана роль АЛА в прогнозировании осложнений при инфекциях разной локализации [4, 12].

На основании вышеизложенного, предлагается использовать АЛА, АКА, БПО, АК в качестве маркеров сепсисогенных штаммов при прогнозировании генерализации инфекционного процесса.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 9 см. REFERENCES)

1. Козлов В.К. Сепсис: этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии. СПб.: Диалект; 2006.

3. Миронов А.Ю., Харсеева Г.Г., Ключкина Т.В. Основы клинической микробиологии и иммунологии: учебное пособие. Ростов-на-Дону: ГОУ ВПО РостГМУ; 2011.
4. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина; 1999.
5. Бухарин О.В., Брудастов Ю.А., Дерябин Д.Г. Изучение антикомplementарной активности стафилококков. Клиническая лабораторная диагностика. 1992; (11-12): 68—71.
6. Леонов В.В., Костерина В.В., Варницына В.В., Тимохина Т.Х., Курлович Н.А. Железозависимый синтез гемолизина Staphylococcus aureus. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012; 153(1): 49—51.
7. Бухарин О.В., Черкасов С.В., Сгибнев А.В., Забирова Т.М., Иванов Ю.Б. Влияние микробных метаболитов на активность каталазы и рост Staphylococcus aureus 6538 P. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2000; 130(7): 80—2.
8. Леонов В.В. Количественная оценка способности условно-патогенных микроорганизмов к образованию биопленки в эксперименте. Клиническая лабораторная диагностика. 2012; (10): 57—9.
10. Розанова С.М., Перевалова Е.Ю., Шевелева Л.В., Крутова К.В., Кырф М.В., Бейкин Я.Б. и др. Современная этиологическая структура бактериемии в отделениях реанимации Екатеринбург. Уральский медицинский журнал. 2011; (13): 52—8.
11. Леонов В.В., Миронов А.Ю. Биопленкообразование оппортунистических микроорганизмов в плазме крови в зависимости от содержания железа. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61(1): 52—4.
12. Гриценко В.А., Брудастов Ю.А., Журлов О.С., Чертков К.Л. Свойства эшерихий, выделенных из организма мышей при бактериальной транслокации после иммобилизационного стресса. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2000; (1): 37—41.
- 2003; 348(16): 1546—54.
3. Mironov A.Yu., Kharseeva G.G., Klyukina T.V. Basics of Clinical Microbiology and Immunology: Study Guide [Osnovy klinicheskoy mikrobiologii i immunologii: uchebnoe posobie]. Rostov-na-Donu: GOU VPO RostGMU; 2011. (in Russian)
4. Bukharin O.V. The Persistence of Pathogenic Bacteria [Persistentsiya patogennykh bakteriy]. Moscow: Meditsina; 1999. (in Russian)
5. Bukharin O.V., Brudastov Yu.A., Deryabin D.G. Study of the anticomplementary activity staphylococci. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 1992; (11-12): 68—71. (in Russian)
6. Leonov V.V., Kosterina V.V., Varnitsyna V.V., Timokhina T.Kh., Kurlovich N.A. Iron-dependent synthesis of hemolysins by Staphylococcus aureus. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. 2012; 153(1): 49—51. (in Russian)
7. Bukharin O.V., Cherkasov S.V., Sgibnev A.V., Zabirova T.M., Ivanov Yu.B. Effects of microbial metabolites on catalase activity and growth of Staphylococcus aureus 6538 P. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. 2000; 130(7): 80—2. (in Russian)
8. Leonov V.V. The quantitative evaluation of capacity of opportunistic pathogenic microorganisms to form biofilms in experiment. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2012; (10): 57—9. (in Russian)
9. Bouza E., Perez-Molina J., Munoz P., Cooperative Group of the European Study Group on Nosocomial Infections (ESGNI). Report of ESGNI-001 and ESGNI-002 studies. Bloodstream infections in Europe. Clin. Microbiol. Infect. 1999; 5(Suppl.2): 2S1—12.
10. Rozanova S.M., Perevalova E.Yu., Sheveleva L.V., Krutova K.V., Kyrf M.V., Beykin Ya.B. et al. Current etiological structure of bacteremia at the intensive care units of Yekaterinburg. Ural'skiy meditsinskiy zhurnal. 2011; (13): 52—8. (in Russian)
11. Leonov V.V., Mironov A.Yu. Biofilm formation of opportunistic microorganisms in blood plasma depending on the content of iron. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2016; 61(1): 52—4. (in Russian)
12. Gritsenko V.A., Brudastov Yu.A., Zhurlov O.S., Chertkov K.L. Escherichia properties, isolated from an organism of bacterial translocation in mice after immobilization stress. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. 2000; (1): 37—41. (in Russian)

REFERENCES

1. Kozlov V.K. Sepsis: Etiologiy, Immunopathogenesis, Conception of Modern Immunotherapy [Sepsis: etiologiya, immunopatogenez, kontseptsiya sovremennoy immunoterapii]. St.Petersburg: Dialekt; 2006. (in Russian)
2. Martin G.S., Mannino D.M., Eaton S., Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N. Engl. J. Med.

Поступила 27.05.16
Принята к печати 15.06.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.71-018.46-002.2:579.22

Шипицына И.В., Розова Л.В., Осипова Е.В.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ БАКТЕРИЙ ACINETOBACTER SPP., ВЫДЕЛЕННЫХ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава России», 640014, Курган, Российская Федерация

Исследованы 17 клинических штаммов бактерий *Acinetobacter spp.*, выделенных из ран больных хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей. У 8 пациентов штаммы *Acinetobacter spp.* были выделены в монокультуре, у 8 — и в составе ассоциации со стафилококками (*Staphylococcus aureus* — 4, *S. epidermidis* — 2, *S. haemolyticus* — 1, *S. capitis* — 1) и у одного пациента — со штаммами *Enterococcus faecalis*.

29% изолятов *Acinetobacter spp.* обладали высокоадгезивными свойствами, 43% — среднеадгезивными, 28% — низкоадгезивными. Средний индекс адгезивности исследуемых штаммов (ИАМ) составил $2,86 \pm 0,02$ ед. Штаммы, обладающие высокоадгезивным потенциалом, были выделены из ассоциаций со *Staphylococcus spp.*

Штаммы *Acinetobacter spp.* характеризовались возрастающей по мере инкубирования активностью формирования биопленки на поверхности 96-луночного планшета. Рассчитанный интегральный коэффициент ($K > 0,5$ ед.) свидетельствовал о высокой доле штаммов, резистентных к выбранным антибиотикам. Наиболее эффективными в отношении *Acinetobacter spp.* были аминогликозиды (гентамицин и тобрамицин) и карбапенемы (меропенем, имипенем). Число резистентных штаммов не превышало 38%.

Проведенное исследование показало, что межмикробные взаимоотношения улучшают способность образующих ассоциацию штаммов *Acinetobacter spp.* к формированию биопленок. Полученные значения биопленкообразующей способности и коэффициента резистентности клинических изолятов *Acinetobacter spp.*, выделенных у больных хроническим остеомиелитом, свидетельствуют об их высокой патогенности.

Для корреспонденции: Шипицына Ирина Владимировна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. микробиологии и иммунологии, e-mail: ivschimik@mail.ru