

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616.9-022:615.33.015.8

**ЗНАЧЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА
И ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
ГОСПИТАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ В ОТДЕЛЕНИИ ГНОЙНОЙ ОСТЕОЛОГИИ**

*В.Н. Митрофанов, Н.А. Гординская, Е.В. Сабирова,
Н.В. Абрамова, Г.Н. Карасева*

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Верхневолжская наб., 18/1
603155, г. Нижний Новгород, Российская Федерация

Проанализированы 434 штамма микроорганизмов, выделенных у пациентов отделения гнойной остеологии. 203 возбудителя инфекции выделены у больных, лечившихся по поводу нагноения после эндопротезирования крупных суставов, 148 – у больных с хроническим остеомиелитом, 83 – с синдромом диабетической стопы. Грамположительных микроорганизмов выделено 302 штамма, Грамотрицательных – 132.

Независимо от нозологии основными возбудителями инфекции были различные стафилококки, третья часть которых экспрессировала *tes A* ген, проявляя фенотип метициллинрезистентных штаммов. Второе место по частоте обнаружения занимали *Ps. Aeruginosa*, среди которых у 9 штаммов из 51 выявлен ген, кодирующий продукцию метало-бета-лактамаз *VIM*-типа. На третьем месте по частоте выделения находились *A. baumannii*. Среди 29 изолятов ацинетобактеров обнаружены 15 штаммов, продуцирующих *OXA-40*-подобные карбапенемазы. Из 19 штаммов *K. pneumoniae* 14 продуцировали бета-лактамазы расширенного спектра.

Таким образом, в отделении гнойной остеологии у пациентов с различными инфекционными процессами выявлены однотипные закономерности в структуре возбудителей инфекции: преобладание стафилококков и циркуляция большого числа полирезистентных к антибиотикам микроорганизмов. Тщательный бактериологический мониторинг дает возможность определения фенотипа и генотипа антибиотикорезистентности и назначения рациональной антимикробной терапии.

Ключевые слова: госпитальная инфекция, антибиотикорезистентность, детерминанты резистентности.

**THE VALUE OF MICROBIOLOGICAL MONITORING AND DETERMINING
THE MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF HOSPITAL MICROFLORA
OF PURULENT OSTEOLOGY DEPARTMENT**

*V.N. Mitrofanov, N.A. Gordinskaya, E.V. Sabirova,
N.V. Abramova, G.N. Karaseva*

Federal State Budgetary Institution «Privolzhsky Federal Research Medical Centre»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Verkhne-Volzhszkaya nab., 18/1
603155, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

434 microbial strains found in Purulent Osteology Department patients were analyzed. 203 infectious agents were found in patients with purulence after major joint prosthetics, 148 – in patients with chronic osteomyelitis, 83 – in diabetic foot patients. Gram-positive microorganisms accounted for 302 strains, gram-negative ones – for 132 strains.

Irrespective of nosology, main infectious agents were represented by various staphylococci, a third of which expressed *mec A* gene displaying a phenotype of methicillin-resistant strains. *Ps. Aeruginosa* was second in detection rate, among which 9 strains out of 51 had a gene encoding VIM-type Metallo-beta-lactamase production. The third place in detection rate belonged to *A. baumannii*. 15 strains producing *OXA-40-like* carbapenemases were found among 29 acinetobacter isolates. 14 out of 19 *K. pneumoniae* strains produced extended spectrum beta-lactamases.

Therefore, similar patterns in infectious agent structure were found in Purulent Osteology Department patients with various infectious processes: staphylococci predominance and circulation of a great number of antibiotic multiresistant microorganisms. A thorough microbiological monitoring enables determining of phenotype and genotype of antibiotic resistance and prescribing a balanced antimicrobial therapy.

Keywords: hospital infection, antibiotic resistance, resistance determinants.

Актуальность проблемы хирургической инфекции определяется значительной распространенностью заболевания, сложностью этиологической диагностики, тяжестью и длительностью лечения. Несмотря на достижения современной медицины, частота неудовлетворительных результатов лечения хирургической инфекции в целом остается достаточно высокой [1-5]. Традиционные схемы лечения больных основаны на хирургической санации очага в комплексе с антибактериальной терапией. Однако на сегодняшний день процесс лечения многократно усложнился за счет распространения приобретенной антибиотикорезистентности возбудителей [6, 7]. Продолжительность нетрудоспособности, стоимость лечения инфекционных осложнений, высокий процент инвалидизации определяют социально-экономическую значимость борьбы с инфекцией в отделениях гнойной хирургии.

Материалы и методы

В работе проанализированы 434 штамма микроорганизмов, выделенных у 384 пациентов, лечившихся в отделении гнойной остеологии ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России в течение 2014 года. Среди всех пациентов 193 человека лечились по поводу глубокого нагноения по-

сле эндопротезирования крупных суставов, 138 больных – по поводу хронического остеомиелита различной локализации, 43 пациента – по поводу синдрома диабетической стопы.

Видовая идентификация микрофлоры проводилась на анализаторе iEMS Reader FM (Labsystems, Финляндия) с помощью набора тест-систем (Lachema, Чехия). Анализ видового состава микрофлоры и устойчивости к антибактериальным препаратам осуществляли с помощью компьютерной программы «Микроб-автомат».

Антибиотикорезистентность определялась диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтон с помощью сенси-дисков (Bio-Rad Laboratories), минимальные подавляющие концентрации препаратов (МПК) рассчитывали на анализаторе антибиотикограмм «ADAGIO» (Bio-Rad Laboratories) [8].

Выявление генов наиболее распространенных метало-β-лактамаз (группы *Vim*, *Imp*, *NDM*) и сериновых карбапенемаз (групп *KPC* и типы *OXA-48*, *OXA-40*), а также видоспецифических *OXA-51* осуществляли методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» с использованием коммерческих

наборов «АмплиСенс MDR MBL-FL», «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL» и «АмплиСенс MDR Acinetobacter OXA-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Амплификация проводилась на приборе «Rotor Gene 6000» (Corbet Research, Австралия) в соответствии с методическими указаниями к наборам. Детекция бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) проводилась с помощью Е-тестов с цефтазидимом и цефтазидим/клавуланатом (Bio Merieux, Франция). Для сравнения зоны задержки использовали штамм *E.coli* ATCC 25922, не продуцирующий бета-лактамазы и штамм *E.coli* ATCC 700603, продуцирующий БЛРС. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica общепринятыми методами.

Результаты и их обсуждение

При изучении этиологической структуры возбудителей инфекции в отделении гнойной остеологии выявлено, что в среднем грамположительных микроорганизмов вдвое больше (302 штамма), чем грамотрицательных (132 штамма). Подавляющее число грамположительных бактерий – это стафилококки.

Анализ структуры грамотрицательных возбудителей показал преобладание неферментирующих грамотрицательных палочек, энтеробактерии выделялись реже. Среди неферментирующих бактерий чаще выделялась *Ps.aeruginosa*, а половину энтеробактерий у пациентов с периимплантной инфекцией и остеомиелитом составила *K.pneumoniae*. Структура возбудителей инфекции в разных группах пациентов представлена в таблице 1.

Таблица 1

Этиология инфекционных процессов у пациентов отделения гнойной остеологии

Возбудители инфекции	Группы пациентов		
	Периимплантная инфекция	Хронический остеомиелит	Синдром диабетической стопы
<i>S.aureus</i>	77	76	16
<i>S.epidermidis</i>	50	25	9
<i>P.aeruginosa</i>	20	19	12
<i>A.baumannii</i>	15	3	11
<i>K.pneumoniae</i>	11	6	2
<i>E.coli</i>	6	2	4
<i>Proteus spp.</i>	4	3	5
<i>E.cloacae</i>	1	0	5
<i>Enterococcus spp.</i>	10	4	12

Из общего числа 203 микроорганизмов, выделенных у пациентов с периимплантной инфекцией, стафилококки составили 62,5%, при этом золотистых стафилококков было выделено 77 изолятов, коагулазонегативных – 50 штаммов. Метициллинрезистентные штаммы среди *S.aureus* (MRSA) составили 33,7%, среди коагулазонегативных стафилококков (MRSE) – 32%, т.е. можно сказать, что среди всех стафилококков – возбудителей периимплантной инфекции – каждый третий изолят является госпитальным штаммом.

Второе место по частоте выделения занимают неферментирующие грамотрицательные палочки (28,0%), среди которых 20 изолятов составили *P.aeruginosa* и 15 – *A.baumannii*. Далее следуют энтеробактерии, которых всего выделено 22 штамма, причем 11 из них – это клебсиеллы. Энтерококки всегда выделялись в ассоциациях с вышеперечисленными микроорганизмами, а не самостоятельно.

Среди неферментирующих грамотрицательных палочек значительное количество штаммов отличались устойчивостью к различным антибактериальным препаратам.

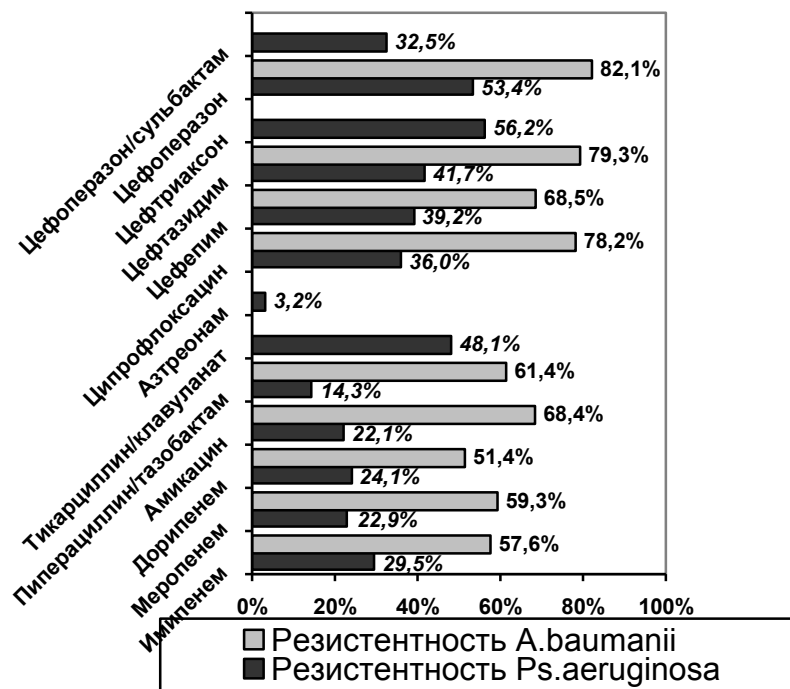


Рис. 1. Резистентность неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных у пациентов с периимплантной инфекцией

Проведенные молекулярно-генетические исследования показали, что 4 изолята *P.aeruginosa* среди выделенных штаммов являлись продуцентами металло-бета-лактамаз *VIM* группы и 1 – *KPC* группы. Из 15 штаммов *A.baumannii* у 9 изолятов выявлено наличие генов *OXA-40* подобных карбапенемаз.

Среди энтеробактерий также встречались полирезистентные штаммы. 8 штаммов *Klebsiella pneumoniae* были полирезистентными в отношении трех и более классов антибактериальных препаратов. Фенотип резистентности *Klebsiella pneumoniae* представлен на рисунке 2.

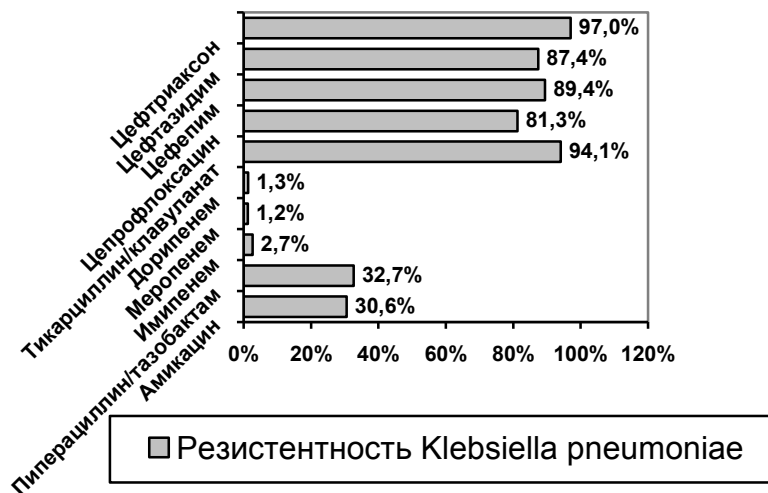


Рис. 2. Резистентность *Klebsiella pneumoniae* – возбудителей периимплантной инфекции

Все полирезистентные штаммы *Klebsiella pneumoniae* продуцировали бета-лактамазы расширенного спектра, продуцентов метало-бета-лактамаз среди клебсиелл не было выявлено.

Анализ 148 штаммов микроорганизмов, выделенных у пациентов с хроническим остеомиелитом, показал, что подавляющее большинство изолятов (68,2%), также как у больных с периимплантной инфекцией, составили *стафилококки*, из них 76 штаммов – *S.aureus* и 25 – *S.epidermidis*. Среди золотистых *стафилококков* было 20 штаммов *MRSA*, а среди

коагулазонегативных – 10 штаммов *MRSE*, т.е. третья часть всех *стафилококков*, выделенных при остеомиелите, были полирезистентными.

Из 23 неферментирующих грамотрицательных палочек (22,9% всех микроорганизмов), выделенных у пациентов с обострением хронического остеомиелита, подавляющее большинство – 19 штаммов – составили *P.aeruginosa*, три штамма *A.baumannii* и один штамм *Alcaligenes faecalis*. Фенотип резистентности синегнойных палочек у пациентов с остеомиелитом в анализируемый период имел свои отличия (рис. 3).

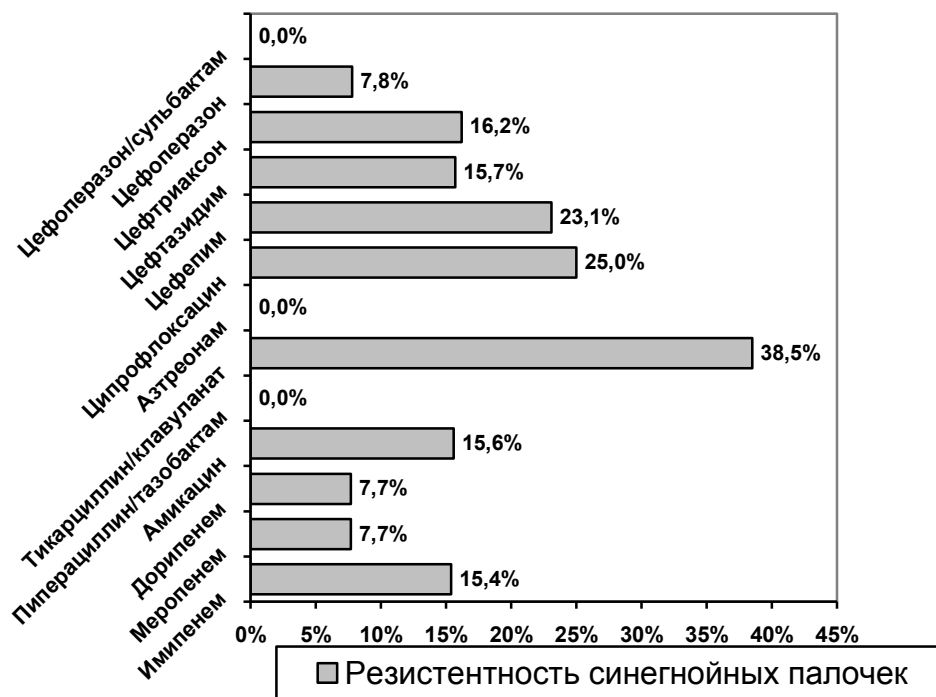


Рис. 3. Резистентность синегнойных палочек, выделенных у пациентов с хроническим остеомиелитом

Как видно из рисунка, резистентность штаммов *P.aeruginosa*, выделенных из остеомиелитических очагов, ниже резистентности изолятов *P.aeruginosa*, обнаруженных при периимплантной инфекции. У двух полирезистентных штаммов выявлен ген, кодирующий продукцию металло-бета-лактамаз *VIM* группы.

Три штамма *A.baumannii*, выделенные у пациентов с хроническим остеомиелитом, были полирезистентными и фенотипически

не отличались от таковых у пациентов с периимплантной инфекцией, кроме того, у них выявлен ген, кодирующий продукцию *OXA-40* подобных карбапенемаз.

Фенотип и генотип резистентности энтеробактерий при остеомиелите не отличался своеобразием. Четыре из шести клебсиелл и один штамм из двух выделенных *E.coli* продуцировали БЛРС, проявляя резистентность ко всем цефалоспорином, фторхинолонам и тикарциллину/клавулатану.

Группа больных с синдромом «диабетической стопы» была самой немногочисленной по сравнению с другими группами пациентов, получавших лечение в отделении гнойной остеологии в отчетный период. Из «диабетических очагов» было выделено 83 микроорганизма, среди которых стафилококки составили 30,1%, что в два раза меньше, чем у пациентов с другими заболеваниями в этом отделении. Золотистых стафилококков обнаружено 16 штаммов, из них 6 – метициллинрезистентных, коагулазонегативных изолятов было 9, из них 4 – метициллинрезистентных, т.е. более

трети всех стафилококков являются «проблемными» и требуют для эрадикации специальной антибактериальной терапии.

Грамотрицательных палочек у пациентов с синдромом «диабетической стопы» было выделено вдвое больше (48,4%), чем у других пациентов, большинство из них (23 штамма) составили неферментирующие бактерии и 16 штаммов – энтеробактерии. Среди грамотрицательных неферментирующих бактерий было 12 изолятов *P.aeruginosa* и 11 *A.baumannii*. Фенотип резистентности неферментирующих палочек представлен на рисунке 4.



Рис. 4. Резистентность неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных у пациентов с синдромом диабетической стопы

Более половины всех неферментирующих бактерий были резистентны к цефалоспорином III-IV поколений. К цефтазидиму устойчивость проявляли 40,1% штаммов *A.baumannii*, в то же время к дорипенему среди ацинетобактеров были устойчивы половина изолятов. Все карбапенемрезистентные штаммы исследованы на наличие бета-лактамаз. Результаты мо-

лекулярных исследований показали, что два штамма *Ps.aeruginosa* экспрессировали ген, кодирующий продукцию металлобета-лактамаз Vim-типа, а у трех штаммов *A.baumannii* выявлен ген *OXA-40* подобных карбапенемаз.

Группу энтеробактерий, выделенных у пациентов с синдромом «диабетической стопы», составили 5 изолятов *Enterobacter*

cloacae, 5 изолятов *Proteus spp.*, 4 штамма *E.coli* и 2 штамма *Klebsiella pneumoniae*. Три штамма энтеробактерий – обе клебсиеллы и одна кишечная палочка – продуцировали БЛРС, остальные изоляты отличались хорошей чувствительностью к антимикробным препаратам разных классов.

Анализ возбудителей инфекции у пациентов отделения гнойной остеологии показал, что чаще других микроорганизмов выделяются стафилококки. Молекулярно-генетические исследования свидетельствуют о высокой частоте обнаружения *mecA* гена как у золотистых, так и коагулазонегативных стафилококков, подтверждая фенотип метициллинрезистентных штаммов. В целом антибиотикорезистентность стафилококков у пациентов с разной патологией была практически одинаковой.

Анализируя устойчивость синегнойных палочек в отношении антимикробных препаратов, следует отметить, что полирезистентные штаммы чаще выделялись у пациентов с перимплантной инфекцией, чем у пациентов с хроническим остеомиелитом и синдромом диабетической стопы. Та же закономерность наблюдалась у выделенных *A.baumannii*. Возбудители перимплантной инфекции нередко обладают фенотипом полирезистентных госпитальных микроорганизмов. Все более широкое назначение карбапенемов ведет к увеличению числа карбапенемрезистентных штаммов среди грамотрицательных микробов, что еще раз подчеркивает необходимость тщательного анализа фенотипа и генотипа полирезистентных штаммов для назначения адекватной антибиотикотерапии.

В силу большого количества бета-лактамаз продуцирующих штаммов среди энтеробактерий, особенно среди клебсиелл, назначение цефалоспоринов, включая

цефепим, не может рассматриваться как рациональная терапия. Для полноценной эрадикации энтеробактерий также необходимо привлечение молекулярно-генетических методов исследования, позволяющих наиболее тщательно подобрать антимикробный препарат.

Заключение

Таким образом, пациентов отделения гнойной остеологии, несмотря на различные нозологические формы, объединяют основные возбудители инфекционных процессов. Чаще других микроорганизмов выделяются *S.aureus* и *S.epidermidis*, третья часть из которых экспрессируют ген *mec A*, а значит, обладают высокой перекрестной устойчивостью ко всем β-лактамам и ассоциированной устойчивостью к антибиотикам других групп. Наибольшую антистафилококковую активность в отношении этих стафилококков показали ванкомицин и линезолид. Второе место по частоте выделения занимают неферментирующие грамотрицательные палочки – *Ps.aeruginosa* и *A.baumannii*, в значительной доле случаев полирезистентные к антимикробным препаратам. Максимально активными для эрадикации *Ps.aeruginosa* и *A.baumannii* были карбапенемы и цефоперазон/сульбактам.

В рамках одного отделения для купирования инфекции без тщательного микробиологического анализа крайне сложно назначить адекватную рациональную антимикробную терапию. В терапии инфекционных процессов у пациентов отделения гнойной остеологии предпочтительной может быть комбинированная антибактериальная терапия, которая эффективна в отношении полирезистентных штаммов особенно при хронической или рецидивирующей инфекции.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Алексеев Д.Г. Комплексное лечение хронического остеомиелита с применением рациональной антиинфекционной химиотерапии и иммунокор-

рекции: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Самара, 2006. 36 с.

2. Божкова С.А., Тихилов Р.М., Краснова М.В., Рукина А.Н., Тишина В.В., Полякова Е.М. Профиль резистентно-

- сти возбудителей как основа выбора эффективного антибиотика при стафилококковых инфекциях протезированных суставов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2013. Т. 15, №2. С. 115-120.
3. Теплякова О.В., Руднов В.А., Шлыкова Г.И., Доценко Т.Г. Септический артрит у взрослых // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015. Т. 17, №3. С. 187-206.
 4. Slater R., Lazarovitch I., Boldur I. Swab cultures accurately identify bacterial pathogens in diabetic foot wounds not involving bone // *Diabet Med.* 2004. Vol. 21. P. 705-709.
 5. Ong K.L., Kurtz S.M., Lau E., Bozic K.J., Berry D.J., Parvizi J. Prosthetic joint infection risk after total hip arthroplasty in the medicare population // *J. Arthroplasty.* 2009. Vol. 24 (6 Suppl.). S105-109.
 6. Гостев В.В., Гончаров А.Е., Грачева М.А., Сидоренко С.В. Распространение генов комплекса Immune evasion cluster и других факторов вирулентности у *Staphylococcus aureus* // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2013. Т. 15, №4. С. 270-279.
 7. Lie S.A., Havelin L.I., Furnes O.N., Engesaeter L.B., Vollset S.E. Failure rates for 4762 revision total hip arthroplasties in the Norwegian Arthroplasties Register // *J. Bone Jt. Surg.* 2004. Vol. 86-B, №4. P. 504-509.
 8. Методические указания МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». М., 2004.
- References**
1. Alekseev DG. *Kompleksnoe lechenie hronicheskogo osteomyelita s primeneniem racional'noj antiinfekcionnoj himioterapii i immunokorrekcii* [Comprehensive treatment of chronic osteomyelitis with the use of a balanced anti-infectious chemotherapy and immune correction]: avtoref. dis. ... kand. med. nauk. Samara; 2006. (in Russian)
 2. Bozhkova SA, Tihilov RM, Krasnova MV, Rukina AN, Tishina VV, Poljakova EM. Profil' rezistentnosti vozбудitelej kak osnova vybora jeffektivnogo antibiotika pri stafilokokkovykh infekcijah protezirovannyh sustavov [Agent resistance profile as a basis for choosing an effective antibiotic for staphylococcal infections of prosthetic joints]. *Klin mikrobiol antimikrob himioter.* [Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy]. 2013; 15(2): 115-120. (in Russian)
 3. Tepljakova OV, Rudnov VA, Shlykova GI, Docenko TG. Septicheskiy artrit u vzroslykh [Septic arthritis in adults]. *Klin mikrobiol antimikrob himioter.* [Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy]. 2015; 17(3): 187-206. (in Russian)
 4. Slater R, Lazarovitch I, Boldur I. Swab cultures accurately identify bacterial pathogens in diabetic foot wounds not involving bone. *Diabet Med.* 2004; 21: 705-9.
 5. Ong KL, Kurtz SM, Lau E, Bozic KJ, Berry DJ, Parvizi J. Prosthetic joint infection risk after total hip arthroplasty in the medicare population. *J Arthroplasty.* 2009; 24 (6) Suppl: S105-109.
 6. Gostev VV, Goncharov AE, Gracheva MA, Sidorenko SV. Rasprostranenie genov kompleksa Immune evasion cluster i drugih faktorov virulentnosti u Staphylococcus aureus [Dissemination of Immune evasion cluster genes and other virulence factors in Staphylococcus aureus]. *Klin mikrobiol antimikrob himioter.* [Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy]. 2013; 15(4): 270-279. (in Russian)
 7. Lie SA, Havelin LI, Furnes ON, Engesaeter LB, Vollset SE. Failure rates for 4762 revision total hip arthroplasties in the Norwegian Arthroplasties Register. *J. Bone Joint Surg.* 2004; 86-B (4): 504-509.
 8. *Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.1890-04 «Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam»* [Guidelines «Susceptibility Testing of Microorganisms to Antibacterial Agents»]. Moscow; 2004. (in Russian)

Митрофанов В.Н. – к.м.н., ведущий научный сотрудник группы гнойной остеологии ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, г. Нижний Новгород.

Гординская Н.А. – д.м.н., руководитель отделения лабораторной диагностики ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, г. Нижний Новгород.
E-mail: info@nniito.ru

Сабирова Е.В. – биолог лаборатории бактериологии ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, г. Нижний Новгород.

Абрамова Н.В. – биолог лаборатории бактериологии ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, г. Нижний Новгород.

Карасева Г.Н. – к.м.н., врач-бактериолог ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, г. Нижний Новгород.