

УДК: 616.9-022.363-036.22:543.51

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ ГОСПИТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ

Е.В. Голошва, А.В. Алешукина, Т.И. Твердохлебова, Э.А. Яговкин

ФБУН Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону

*Изучены изоляты неферментирующих бактерий (НФБ) из стационаров Ростова-на-Дону. Исследовано 9341 проба. Идентификация изолятов была выполнена с использованием Vitek 2 и методом масс-спектрометрии (Bruker Daltonik MALDI Biotyper). Изучено воздействие на изоляты НФБ различных дезинфектантов. Изучена биопленкообразующая активность штаммов неферментирующих бактерий до и после обработки различными дезинфектантами. НФБ могут быть расценены как возбудители инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Основными потенциальными возбудителями в стационарах по значимости в порядке убывания были *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* и *Acinetobacter baumannii*, обнаруживаемые у людей и на объектах в отделениях. Все выделенные НФБ были панантибиотикорезистентными. Обсуждается возможность использования масс-спектрометрии для проведения эпидемиологического анализа случаев инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП).*

Ключевые слова: неферментирующие бактерии, масс-спектрометрия, антибиотики, дезинфектанты, биопленки.

APPLICATION OF METHOD OF MASS SPECTROMETRY BY EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF HEALTHCARE ASSOCIATED INFECTIONS, CAUSED BY NONFERMENTING BACTERIA

E.V. Goloshva, A.V. Aleshukina, T.I. Tverdokhlebova, E.A. Yagovkin.

FBCI Rostov Scientific Research Institution of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don.

*Isolates of not fermenting bacteria (NFB) from hospitals of Rostov-on-Don are studied. It is surveyed 9341 tests. Identification of isolates were carried out with use Vitek-2 and by method of mass spectrometry (Bruker Daltonik MALDI Biotyper). It was studied the effects of different disinfectants on NFB isolates. It was studied biofilm formation activity of stamms of bacteria before and after treatment different disinfectants. NFB can act as the Half Care -Associated Infections (HCAI) main potential activator in hospitals: on the importance in decreasing order of *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii* found in people and on objects in offices. Strains of NFB were pan antibiotics rezistens. Possibility of use of mass spectrometry for carrying out the epidemiological analysis of cases of HCAI is discussed.*

Key words: not fermenting bacteria, mass spectrometry, antibiotics, disinfectants, biofilms.

Значительное место среди госпитальных инфекций занимают грамотрицательные неферментирующие бактерии (НФБ), которые характеризуются следующими клинически значимыми свойствами: природной устойчивостью ко многим антибиотикам, высокой резистентностью к дезинфектантам и распространением в стационарах от пациента к пациенту, зачастую с помощью рук медицинского персонала и медицинского оборудования. [7]. Среди этой группы микроорганизмов доминируют представители нескольких родов: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* [6]. Частота выделения неферментирующих грамотрицательных бактерий достигает 15% от всех аэробных и факультативно анаэробных грамотрицательных бактерий, из них около 70% приходится на долю *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. и *S. maltophilia*. [4]. Большое значение такие НФБ, как *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia*, имеют при инфекциях нижних

дыхательных путей у больных муковисцидозом, у которых данные микроорганизмы способны вызвать эндокардиты, некротизирующую пневмонию с септициемией, зачастую заканчивающуюся летальным исходом (так называемый «сепация - синдром») [2]. Однако, до сих пор остается не выясненным вопрос о том, почему неферментирующие бактерии в одних случаях выделяются от больных и не вызывают инфекционных осложнений, а в других вызывают тяжёлые поражения органов, нередко с летальным исходом. Поэтому на данный момент изучение изменений микробиологических и культуральных свойств этих микроорганизмов, особенно в системе Quorum

Sensing (QS) [5], регулирующей экспрессию микробных генов в ответ на увеличение плотности популяции, остается актуальным.

Отличие в «поведении» планктонных и фиксированных микроорганизмов приводит к тому, что в настоящий момент происходит формирование новой ветви профилактической и терапевтической медицины, нуждающейся в разработке фармацевтических и нефармацевтических подходов к лечению заболеваний, вызываемых возбудителями-продуцентами биопленок[1]. В связи с этим актуальным является изучение влияния биотических и абиотических факторов на биопленкообразование бактерий, в частности.

Также актуальным является применение в лабораторной диагностике идентификации бактерий по их уникальным белковым профилям с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной десорбцией/ионизацией (MALDI - TOF), которая, благодаря своей точности и экономичности, позволяет повысить достоверность эпидемиологического анализа госпитальных инфекций.

Цель работы - изучить возможности масс-спектрометрии в эпидемиологическом анализе неферментирующих бактерий-потенциальных возбудителей внутрибольничных инфекций в разных стационарах.

Материалы и методы

Обследовано 6547 от пациентов, находившихся на лечении в стационарах г. Ростова-на-Дону, 2794 смывов с оборудования и внешней среды ЛПУ. Идентификацию выделенных микроорганизмов и изучение их чувствительности к антибиотикам проводили с использованием карт Vitek-2. Биотипирование культур и изучение чувствительности культур к дезинфектантам осуществляли методом масс-спектрометрии (Bruker Daltonik MALDI Biotyper).

Изоляты неферментирующих бактерий были подвержены действию различных дезинфектантов: 6% перекиси водорода, 70% этанола, препаратов «Сульфохлорантин Д» (Россия), «Бриллиант» (компания «Формула 25»), «Форекс-хлор-комплит (ООО ДНПК «Альфа», Россия), «Форимикс» («Ника Форимикс», Россия), «Ультрадон» (ООО «Дон-дез»). Наряду с рабочими концентрациями указанных препаратов использовали в качестве сублетальной дозы 10-кратное разведение рабочей концентрации дезсредств. Тестируемые штаммы выдерживали в растворах препаратов при экспозициях, рекомендованных соответствующими инструкциями. Затем проводили дозированные посевы на микробиологический агар (НПО «Микроген»). Клоны микроорганизмов, полученные в контрольных посевах и под воздействием дезинфектантов, были проанализированы методом масс-спектрометрии. Также у клонов была изучена способность к биопленкообразованию до обработки дезинфектантами и после в соответствии с методикой [3].

Результаты и обсуждение

В детской больнице в целом было выявлено 689 штаммов неферментирующих бактерий (36,3±1,1% от общего числа культур); из кишечника 315 случаев (45,7±1,9% от количества выделенных НФБ) и из прочих биотопов 374 (54,3±1,9%). Неферментирующие бактерии чаще выявлялись в смывах из бронхов в пульмонологических отделениях и ОРИТ - в 64,9±2,5% (196), при этом *Pseudomonas aeruginosa* выявлялась в 38,8±2,5% (76). Остальные НФБ распределились следующим образом: *Stenotrophomonas maltophilia* 38,8±2,5% (76); *Moraxella nonliquifaciens* 8,7±2,0% (17); *Pseudomonas alcaligenes* 7,7±1,9% (15); *Acinetobacter haemolyticus* 5,6±1,5% (11); *Burkholderia cepacia* 0,4±0,1 % (1). В анализах мочи (нефрологических и урологических отделений) неферментирующие бактерии были выявлены в 79,4±2,1% (150). Доля *P. aeruginosa* составила 80±2,5% (120). Остальные неферментирующие бактерии распределились в убывающем порядке: *P. alcaligenes* 8,3±2,4% (10); *A. haemolyticus* 7,5±2,4% (9); *S. maltophilia* 5 ±2,0% (6); прочие 4,2±1,8% (5). К хлорамфениколу, триметаприму, сульфаметоксипразолу, сульфаметаксозону, цефатаксиму, ампициллину все тестируемые культуры оказались устойчивыми в 100% случаев. Чувствительность к бактериофагу оказалась невысокой (+, ++) у 22,6±1,6% культур (156).

Изучены культуры неферментирующих бактерий, выделенные от взрослых больных людей, находящихся на стационарном лечении (35 культур). Среди них 71±2,1% составляли *Pseudomonas aeruginosa* (25), *Acinetobacter haemolyticus* и *Acinetobacter baumannii* по 14,5±2,5% (5). Чаще всего *P. aeruginosa* поступали из хирургического отделения 40±2,0% (14 штаммов) и отделения ЛОР 28,6±2,3% (10 штаммов). Все выделенные культуры были полиантибиотикорезистентными. *P. aegu-*

gínosae, выделенные из зева, носа и прочих биотопов, оказались наиболее чувствительными к карбепенемам 2 поколения, аминогликозидам 3 поколения. Штаммы, выделенные из кишечного биотопа были более чувствительными к карбепенемам 2 поколения, аминогликозидам 3 поколения, бета-лактамам цефалоспорином 3 поколения. Сопоставление масс-спектрометрических профилей *Pseudomonas aeruginosa* выявило, что в отделении хирургии в 71,4% культур преобладали однородно низко пролетные пики. В остальных случаях (28,6±2,3%) пики были высокопролетные. В то же время среди культур, полученных у больных ИОП- отделения, в 60±2,5% случаев были выявлены профили с высоко-пролетными пиками, а в 40±2,0%- низко-пролетные профильные пики.

В результате исследования проб-смыслов с оборудования в отделениях госпиталя было выявлено, что основным микроорганизмом были *Acinetobacter* sp.- *A. baumannii* (66±2,5%) и *Acinetobacter iwoffii* (34±1,9%). У сотрудников *Pseudomonas aeruginosa* встречались в 25%. Устойчивость к антибактериальным препаратам из смывов находилась в пределах 83,3%-91,6% тестируемых антибиотиков. У сотрудников штаммы были резистентны в 83,3%-100% случаев.

Исследование проб внешней среды в больнице водников в течение 3-х лет показало, что нестандартных проб было обнаружено ниже уровня по РФ: среди материала на стерильность 0,16-0,33%; воздушной среде 1,5-5,42% и смывы на качество текущей дезинфекции 0,51-1,92% нестандартных проб. Среди изолированных микроорганизмов НФБ составляли 15-22%, из которых на долю *Pseudomonas aeruginosa* приходилось 67%, а остальные в равных долях составляли *A. baumannii* и *S. maltophilia*. Штаммы НФБ в 100% были высоко устойчивыми к тестируемым антибактериальным препаратам.

Результаты исследования степени воздействия дезинфицирующих средств на штаммы неферментирующих бактерий, выделенных в стационарах, показали, что в рабочих концентрациях и при предлагаемых экспозициях были эффективны все тестируемые дезинфектанты, кроме этанола, к которому оказались устойчивы 80% культур. При 10-ти кратных разведениях препаратов был отмечен рост 25-40 % культур. Полученные селективно клоны разительно отличались по масс-спектрометрическим показателям от исходных культур со значительным увеличением амплитуды пиков на сравнительных профилях. Наиболее часто отмечено мутирование тестируемых культур в присутствии 10-кратно и 100-кратно разведенного «Сульфаклорантина Д». «Ультрадон» оказался наиболее эффективным по отношению ко всем тестируемым культурам.

Показано, что снижение концентрации препаратов в 10 и 100 раз позволило сохранять способность к росту у большинства тест-культур, при этом масс-спектрометрически отмечено существенное изменение профиля селективных клонов.

В отношении биопленкообразующей способности неферментирующих бактерий до обработки дезинфектантами большинство штаммов (88±1,9%) имели среднюю и высокую степень выраженности признака. В процессе обработки селективными дозами препаратов биопленкообразующая активность культур снижалась.

Выводы:

1. В качестве основного потенциального возбудителя ИСМП в стационарах г. Ростова-на-Дону могут выступать неферментирующие бактерии: по значимости в порядке убывания *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* и *Acinetobacter baumannii*, обнаруживаемые у людей и на объектах в отделениях.

2. Штаммы неферментирующих бактерий высоко резистентны к тестируемым антибиотикам, относятся к гентамицин- резистентным, что свидетельствует об их госпитальной принадлежности.

3. Из тестируемых дезинфекционных средств неэффективным оказался препарат «Бриллиант»: сохранялись ростовые характеристики микробов, отсутствовали признаки денатурации.

4. Масс-спектрометрическое исследование культур до и после обработки дезинфектантами позволяет быстро и эффективно подобрать средство для проведения обработки помещений в отделениях.

5. Обсуждается возможность использования масс-спектрометрии профилей культур, выделенных из окружающей среды стационаров и от пациентов, для проведения эпидемиологического анализа случаев ИСМП.

Литература

1. Белобородова Н.В., Байрамов И. Т. Микробные биопленки // В сб.: Гнойно-септические заболевания у детей с участием регионов России и стран СНГ. – М., 2009. – С. 7-39.
2. Голуб А.В.. Бактериальные биопленки - новая цель терапии? // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2012. - Том 14, № 1. - С. 23-29.
3. Кузнецова М.В., Николаева Н.В., Розанова С.М., Карпунина Т.И. Формирование биопленок нозокомиальными штаммами *Pseudomonas aeruginosa*. // Журн. микробиологии. – 2011. - №4. – С. 8-14.
4. Розова Л.В., Годовых Н.В., Науменко З.С. Видовой состав неферментирующих бактерий у

больных ортопедо-травматологического профиля // Вестник Курганского государственного университета №1 (15). - Серия «Естественные науки», выпуск 2. Изд-во Курганского государственного университета, 2009. С. 26-29.

5. Чернуха М.Ю., Данилина Г.А., Алексеева Г.В., Шагинян И.А., Гинцбург А.Л. Роль регуляторной системы "Quorum sensing" в образовании биопленок бактериями *Burkholderia cepacia* и *Pseudomonas aeruginosa* // Журн. микробиологии. – 2009. - №4. -С. 39-43.

6. Чернявский В.И., Бирюкова С.В., Гришина Е.И. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии нозокомиальных инфекций и проблемы антибиотикорезистентности // Annals of Mechnikov Institute. – 2010. - N 4. - www.imiamn.org.ua/journal.htm

7. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, эпидемиологические и микробиологические особенности // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2005. - Том 7, №3. – С. 271-285.

Сведения об авторах

Голошва Елена Владимировна - кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования ФБУН Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора, E-mail: goloshvae@mail.ru,

Алешукина Анна Валентиновна - доктор медицинских наук, руководитель лаборатории вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования ФБУН Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора,

Твердохлебова Татьяна Ивановна - доктор медицинских наук, директор ФБУН Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора,

Яговкин Эдуард Александрович - доктор медицинских наук, заместитель директора по научно-производственной деятельности ФБУН Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора.