

# Ендемичен клон от нозокомиални щамове *Pseudomonas aeruginosa* в клиника за интензивни грижи на Специализирана белодробна болница в София

Д-р Таня Стратева,<sup>1</sup> г-р Добринка Иванова,<sup>2</sup> проф. Иван Митов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Категора по микробиология, Медицински университет, София; <sup>2</sup>Втора МБАЛ, София

## Резюме

Бяха проведени фенотипни и молекулярно-генетични епидемиологични проучвания сред 29 проблемни нозокомиални щамове *Pseudomonas aeruginosa*, изолирани в Клиниката за интензивни грижи на УБ по белодробни болести „Света София“ в периода 1999–2002 г. Щамовете бяха типирани посредством профилите на антимикробна чувствителност (резистотипове) и случайно амплифициране на полиморфна ДНК чрез полимеразно-верижна реакция (RAPD-PCR). Бяха открити общо 10 резистотипа, без доказване на преобладаващ. При проучените щамове *P. aeruginosa*, изолирани от различни пациенти и клинични материали, броят на генерираните фрагменти с RAPD-4 прајмер беше 18, а на RAPD моделите – 12. Сегем от RAPD профилите включваха само по един щам. Бяха установени пет клъстера, като клъстер I включваше 7 щамове *P. aeruginosa* с идентичен RAPD профил, клъстер II – 5 щамове, клъстер III – 4 щамове, клъстер IV – 3 щамове, и клъстер V – 2 щамове. Между петте клъстери беше доказано високо клонално сходство (около 70%). В заключение, в мониторираната клиника е доказано персистиране на ендемичен клон, включващ щамове *P. aeruginosa* с проблемна антибиотична резистентност, за период от 3½ години.

**Ключови думи:** *Pseudomonas aeruginosa*, резистотипове, RAPD-PCR, ендемичен клон

**Endemic clone of Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* Strains in an Intensive Care Clinic of Specialized hospital for Pulmonary Diseases in Sofia**

Dr. Tanya Strateva,<sup>1</sup> Dr. Dobrinka Ivanova,<sup>2</sup> Prof. Ivan Mitov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Medical University of Sofia;

<sup>2</sup>Second Multiprofile Active Treatment Hospital, Sofia

## Abstract

There were performed phenotypic and molecular-genetic investigations among 29 problematic nosocomial strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the Intensive Care Clinic of the University hospital for pulmonary diseases "Sveta Sofia" during 1999-2002. The isolates were typing using the profiles of antimicrobial susceptibility (types of resistance)

and Random amplification of polymorphic DNA by polymerase chain reaction (RAPD-PCR). Ten types of resistance were found, without a predominant type. Eighteen bands generated by RAPD-4 primer and twelve RAPD profiles were revealed in the studied strains of *P. aeruginosa* isolated from different patients and clinical specimens. Seven of the fingerprints included only one strain. Five clusters were established, from which cluster I was presented by 7 *P. aeruginosa* isolates with an identical RAPD pattern, cluster II – by 5 strains, cluster III – 4, cluster IV – 3, and cluster V – 2 isolates, respectively. A high clonally relatedness (approximately 70%) was proved between the strains belonging to the five clusters. In conclusion, during a period of 3½ years in the monitored clinic, a persistent endemic clone consisting of problematic *P. aeruginosa* strains is established.

**Използвани съкращения:** КИГ – Клиника за интензивни грижи, УБ – Университетска болница, АМЛС – антимикробни лекарствени средства, RAPD-PCR – случайно амплифициране на полиморфна ДНК чрез полимеразно-верижна реакция.

## Въведение

*Pseudomonas aeruginosa* е един от водещите причинители на нозокомиални инфекции в световен мащаб, в това число: пневмонии, уроинфекции, инфекции на хирургичните рани, бактериемии и системни инфекции в имunosупресирани пациенти.

Отделенията за интензивни грижи се характеризират с висока ендемичност на *P. aeruginosa* и чести взривове на вътреболнични инфекции.

Целта на настоящото изследване е да се проведат фенотипни и молекулярно-генетични епидемиологични проучвания сред проблемни нозокомиални щамове *P. aeruginosa*, изолирани в Клиниката за интензивни грижи (КИГ) на Университетска болница (УБ) по белодробни болести „Света София“, в периода 1999–2002 г.

**Материали и методи**

**Бактериални щамове.** В проучването бяха включени 29 избрани нозокомиални щамове *P. aeruginosa* с проблемна антимикуробна резистентност, изолирани в КИГ на УБ по белодробни болести „Св. София“, в периода 1999–2002 г. Разпределението по клинични материали беше следното: бронхоалвеоларен лаваж (n=10), хрчка (n=9), трахеални промивни води (n=5), плеврален пунктат (n=2), носен секрет (n=2) и секрет от грен (n=1).

**Типиране на база профили на антибиотична чувствителност.** Бяха използвани резултатите от определяне на чувствителността към антимикуробни лекарствени средства (АМЛС) на *P. aeruginosa* чрез стандартни методи. Изпитваните изолати се групираха на базата на различия в чувствителността към отделните антибиотици (профили на антибиотична чувствителност).

**Типиране посредством случайно амплифициране на полиморфна ДНК чрез полимеразно-верижна реакция (Random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR).** Изолирането на ДНК от щамове *P. aeruginosa* беше осъществено чрез Illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare). RAPD анализът беше извършен с Ready-To-Go RAPD Analysis Beads (GE Healthcare) според указанията на производителя. Амплификацията беше изпълнена с 2 µl ДНК, 2,5 µl (25 pmol) праймер RAPD-4 (5'-AAGAGCCCCGT-3'), Taq ДНК полимеразата (AmpliTaq™ DNA polymerase и Stoffel фрагмент), dNTPs (0,4 mM от всяко dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2,5 µg BSA и буфер [3 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM

KCl, 10 mM Tris, pH 8.3] в краен обем 25 µl. Беше приложена следната термична програма: един цикъл от 5 мин. на 95°C беше последван от 45 цикъла на денатурация за 1 мин. на 95 °C, свързване с праймера за 1 мин. на 36 °C и елонгация на веригата за 2 мин. на 72 °C.<sup>1</sup> За контрол на реакцията бяха използвани два контролни щамове – *E. coli* C1a и *E. coli* BL21 (DE3), амплифицирани с RAPD-4 праймер. Амплификационните продукти бяха сравнявани чрез електрофореза на 5 µl от пробата в 2% агарозен гел, оцветени с етидиев бромид и фотографирани под UV светлина. Генерираните линии бяха анализирани чрез използване на коефициента на Dice (коефициент на сходство) за всяка двойка изолати.

**Резултати и обсъждане**

В България епидемиологията на нозокомиалните инфекции, причинени от *P. aeruginosa*, е проучвана с помощта на различни фенотипни методи – биотипиране, продукция на пиоцианин, серотипиране, фаготипиране и модели на антимикуробна резистентност, както и чрез използване на плазмиден профил.<sup>2,3</sup>

В настоящото проучване респираторните нозокомиални изолати *P. aeruginosa* бяха първоначално типизирани на базата на различия в тяхната чувствителност към АМЛС. Резултатите от резистотипирането са представени в табл. 1. Както е видно от таблицата, бяха открити общо 10 резистотипа. Не беше установено явно доминиране на някой от резистотиповете. Сред щамове *P. aeruginosa* от КИГ водещо беше разпространението на групи *e* (24,1%), *f* (24,1%) и *a* (17,2%).

Антимикуробни лекарствени средства	Група <i>a</i> (n=5)	Група <i>b</i> (n=2)	Група <i>c</i> (n=1)	Група <i>d</i> (n=1)	Група <i>e</i> (n=7)	Група <i>f</i> (n=7)	Група <i>g</i> (n=3)	Група <i>h</i> (n=1)	Група <i>i</i> (n=1)	Група <i>j</i> (n=1)
Carbencillin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Azlocillin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Piperacillin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Piperacillin+TZB	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R
Ceftazidime	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R
Cefoperazone	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
Cefepime	R	R	S	R	I/R	S/I	S	R	R	R
Cefpirome	R	R	S	R	I/R	S/I	S	R	R	R
Aztreonam	R	R	S	R	S/I	S	S	R	R	S
Imipenem	I/R	R	R	S	S	S	S	R	R	S
Meropenem	R	I/R	R	S	S	S	S	R	R	R
Amikacin	R	R	I	R	I/R	S	S	R	S	R
Gentamicin	I/R	R	R	R	R	S	I/R	R	S	R
Tobramycin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Netilmicin	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R
Ciprofloxacin	I/R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
Polymyxin B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

КИГ – Клиника за интензивни грижи; TZB – tazобастат; S – чувствителни, I – междинно чувствителни, R – резистентни

Табл. 1. Профили на антибиотична чувствителност при 29 щамове *P. aeruginosa*, изолирани в КИГ на УБ по белодробни болести „Света София“, 1999-2002 г.

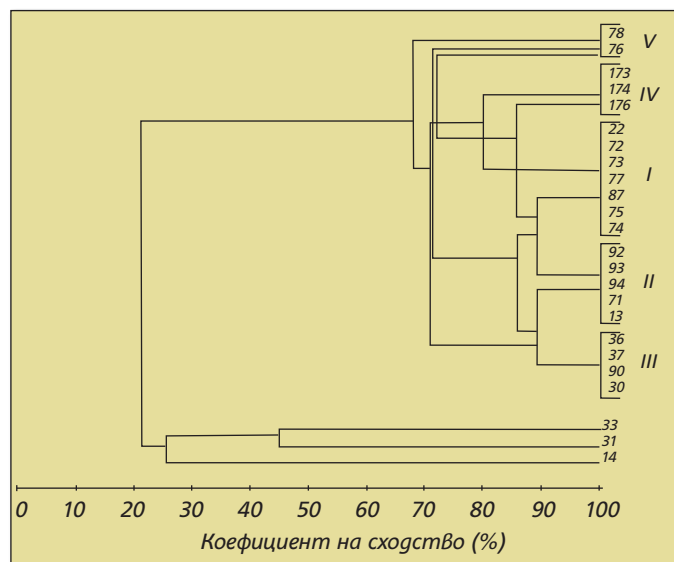
Анализът на установените профили на антибиотична чувствителност показва висока честота на изолиране (31%) на „randrug-resistant“ и „multidrug-resistant“ *P. aeruginosa*,<sup>4</sup> принадлежащи към четири от резистотиповете (*a*, *b*, *d* и *j*).

Разпределението на нозокомиалните щамове в голям брой профили на антибиотична чувствителност и особено липсата на явно преобладаващ резистотип не насочват към взривове от ВБИ, причинени от *P. aeruginosa*, през съответния период на проучване.

### Епидемиологично типирание посредством RAPD-PCR

Броят на генерираните фрагменти (с големина от 250 до 1900 bp) с RAPD-4 праймер беше 18, а на RAPD моделите – 12. Сегем от RAPD профилите включваха само по един щам. Четири от изследваните щамове експресираха уникални профили. При RAPD анализа бяха установени пет клъстера, като клъстер I включваше 7 щамове с идентичен RAPD профил, клъстер II – 5 щамове, клъстер III – 4 щамове, клъстер IV – 3 щамове, клъстер V – 2 щамове. Между петте клъстера беше доказано високо клонално сходство, на базата на сравнение и използване на коефициента на Dice. Сходството между I и II група (SI, II) беше 89%; SII, III – също 89%; SI, II, III – 86%; SI, II, IV – 86%; SI, IV – 80%; SI, II, III, IV – 71%; SI, II, III, V – 71%; SI, II, IV, V – 71%; SI, II, III, IV, V – 68%. Връзките между петте групи (клъстери) са представени в дендрограмата на фиг. 1. Може да се приеме, че щамовете от петте клъстера (общо 21) принадлежат към един клон, тъй като SI, II, III, IV, V (68%) беше много близък до критичната стойност за клонална връзка (70%), а същевременно SI, II, III, V и SI, II, IV, V бяха 71%. На дендрограмата са представени три щамове (№ 33, 31 и 14), които не принадлежат към клона от 21 щамове *P. aeruginosa*. Както е видно от фигурата, S33, 31 беше 44%; S33, 34, 14 – 25%; а връзката на трите щамове с щамовете от клона беше едва 22%.

В обобщение, в КИГ на УБ по белодробни болести „Света София“ бяха установени 21 нозокомиални щамове *P. aeruginosa* с висока степен на клонално сходство (около 70%), изолирани от клинични материали от дихателна система на различни пациенти, за период от над 3 години. Това беше основание да се приеме персистирането на ендемичен клон<sup>5</sup> *P. aeruginosa* в периода 1999–2002 г. Щамовете от клона показаха фенотипна резистентност към поне две от основните групи антипсевдомонадни АМЛС – цефалоспоринови от 3-4 поколение, карбапенеми, аминогликозиди и флуорохинолони, а шест от тях (28.6%), отнасящи се към резистотипове *a* (n=4), *c* (n=1) и *d* (n=1), бяха полirezистентни.



Фиг. 1. Дендрограма, илюстрираща връзката между 24 нозокомиални щамове *P. aeruginosa*, изолирани в КИГ през 1999–2002 г. Дендрограмата е основана на анализа с коефициента на Dice на RAPD-профилите, генерирани с RAPD-4 праймера. Изолати с коефициент на сходство (SAB)  $\geq 70\%$  се приемат за клонално свързани.

Персистирането на ендемичен клон *P. aeruginosa* в интензивно отделение, за толкова дълъг период от време, може да се обясни с някои от инструменталните и архитектурните особености, характерни за повечето отделения от този тип у нас. В тези отделения специфичното медицинско оборудване включва: ендотрахеални тръби, трахеостоми, апарати за изкуствена вентилация, аспирационни катетри, сонди за хранене и др. Респираторното оборудване лесно се контаминира при директния контакт с кожата и лигавиците на пациента или чрез респираторните секрети.<sup>6</sup> Допълнителна контаминация може да се получи и при неправилно манипулиране на медицинския персонал. Освен това, важна част на апаратите за обдишване са овлажнителите (небулайзери). От особено епидемиологично значение при водните екосистеми, широко разпространени в отделенията за интензивни грижи, е наличието на биофилм. Биофилмът съдържа микроорганизми и макромолекули от биологичен произход, които се натрупват като комплексен гел върху различни обекти от болничната среда. Той представлява динамична екосистема с широк спектър микроорганизми (бактерии, дрожди, алги, протозои, нематоди, ларви на насекоми) и често включва патогенни агенти, особено *P. aeruginosa* и *Legionella spp.* Отделни микроорганизми могат да се откъснат от повърхността му при механично въздействие или вибрации (каквито има по време на ремонт).

От изключително значение за намаляване на разпространението на микроорганизми в болничната среда е: планирането на лечебните заведения за болнична помощ, както и извършването на

реконструкция и преустройство, да бъдат съобразени със световните стандарти по качество (ISO 9000 и ISO 14000). В съответствие с тези стандарти, за предотвратяване на излагането на пациентите на риск от инфекция, се обособяват функционални зони. Архитектурното зонирание определя отделенията за интензивни грижи като част от високорисковите зони в болничните заведения. За високорисковите зони са необходими специални вентилационни инсталации, при правилна циркулация на които чистият филтриран въздух разрежда и отстранява бактериалната контаминация. Други важни противоепидемични мерки са: строг контрол върху организацията на потоците на движение (определяне на зони на силен и слаб трафик); изисквания към качеството на водата за специфични медицински цели (напр. водата в небулайзерите да бъде стерилна); изисквания към болничните отпадъци; адекватен хигиенен режим в интензивните отделения; постоянно обучение на персонала; усъвършенстване на асептичните техники и др.

Преди няколко години чрез използвания в настоящото проучване молекулярно-генетичен метод за типирание (RAPD-PCR) бяха доказани ендемични карбапенем-резистентни щамове *P. aeruginosa*, продуценти на VIM-тип карбапенемази, в италианска университетска болница.<sup>7</sup> Тези щамове бяха отнесени към два клъстера, като в по-многобройния попаднаха щамове с blaVIM-1 гени, а във втория – с blaVIM-2. Постепенното нарастване на броя на VIM-1-продуциращи *P. aeruginosa* доведе до експанзия на ендемичния клон и циркулиране на такива щамове в различни италиански болници.<sup>8</sup>

RAPD-PCR е широко прилаган за типирание на нозокомиални и придобити в обществото щамове *P. aeruginosa*,<sup>9</sup> а така също и на изолати от болни с муковисцидоза.<sup>10</sup> Изборът на този молекулярно-генетичен метод в това проучване беше направен с оглед на неговите безспорни предимства – лесна постановка, лесна интерпретация, сравнително ниска цена.<sup>11</sup> Някои от недостатъците, които съществуват при мануално приготвяне на Master mix, като ниска възпроизводимост и липса на стандартизираност, успешно се преодоляват при използване на стандартизирани реагенти.<sup>12</sup> Извършването на реакцията посредством Ready-To-Go RAPD Analysis Beads, в съчетание с ДНК-екстракция чрез kit (напр. Illustra bacteria genomic Prep Mini Spin Kit), води до висока възпроизводимост и дискриминиращ капацитет. RAPD анализът се счита за успешен молекулярен метод от първа линия, който за по-точно генотипирание на изолатите би следвало да се съчетава с pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) или amplified fragment length polymorphism (AFLP).<sup>13</sup>

## Заклучение

В КИГ на УБ по белодробни болести „Св. София“ бяха установени пет клъстера, включващи общо 21 проблемни нозокомиални щамове *P. aeruginosa*, с висока степен на клонално сходство (около 70%). Щамовете бяха изолирани от различни клинични материали и пациенти, за период от 3½ години. Това е основание да се приеме персистирането на ендемичен клон в клиниката за периода 1999-2002 г.

## Литература

1. Стратева, Т. (2008). Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху механизмите на резистентност и факторите на вирулентност на клинични щамове *Pseudomonas aeruginosa*. Дисертация за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“. София, 2008 г.
2. Пенчева, П., Е. Сафов, М. Лесева. (1994). Съвременна характеристика на щамовете *Pseudomonas aeruginosa*, изолирани от болни с термична травма. *Инфектология*; XXXI, бр. 2: 22-23.
3. Сафов, Е. (2003). Съвременни подходи при проучване на проблемни за болничната патология микроорганизми. Дисертация за присъждане на научната степен „Доктор на науките“. София, 2003 г.
4. Wang, C. Y., J. S. Jerng, K. Y. Cheng et al. (2006). Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients: clinical features, risk-factors and outcomes. *Clin. Microbiol. Infect.*; 12: 63-68.
5. Van Belkum, A., P. T. Tassios, L. Dijkshoorn et al. (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.*; 13 (suppl. 3): 1-46.
6. Курчева, А., Д. Паскалев, М. Христова. (2006). Нозокомиална пневмония при болни на изкуствена белодробна вентилация. *Инфектология*; XLIII, бр. 4: 41-45.
7. Lagatolla, C., E. Tonin, C. Bragadin et al. (2004). Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo-β-lactamase determinants in European hospital. *Emerg. Infect. Dis.*; 10: 535-538.
8. Lagatolla, C., E. Edalucci, L. Dolzani et al. (2006). Molecular evolution of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a nosocomial setting of high-level endemicity. *J. Clin. Microbiol.*; 44: 2348-2353.
9. Hadi, U., M. Chaar, R. F. Jaafar, G. M. Matar. (2007). Comparative analysis of hospital-acquired and community acquired *Pseudomonas aeruginosa* strains in a Tertiary Care Medical Center. *J. Appl. Res.*; 7: 233-237.
10. Mahenthalingam, E., M. E. Campbell, J. Foster et al. (1996). Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.*; 34: 1129-1135.
11. Кантарджиев, Т., П. Ангелов, С. Панаѝотов и съавт. (2006). Молекулярни методи за епидемиологично типирание на медицински значими микроорганизми. Сборник научни трудове на IV Национален Конгрес по клинична микробиология на Българската Асоциация на Микробиолозите. Пловдив, 6-8 април 2006 г.: стр. 9-15.
12. Vogel, L., G. Jones, S. Triep et al. (1999). RAPD typing of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates using standardized reagents. *Clin. Microbiol. Infect.*; 5: 270-276.
13. Speijer, H., P. H. M. Savelkoul, M. J. Bonten et al. (1999). Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an Intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.*; 37: 3654-3661.