

МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ В СИСТЕМЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА В СТАЦИОНАРЕ

Орлова О.А.^{1,2}, Замятин М.Н.¹, Юмцунова Н.А.¹, Лашенкова Н.Н.¹,
Акимкин В.Г.², Савочкина Ю.А.*², Скачкова Т.С.²

УДК: 616-036.22:577.21

DOI: 10.25881/BPNMSC.2018.12.73.019

¹ Национальный медико-хирургический Центр имени Н.И. Пирогова, Москва

² Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва

Резюме. В каждой медицинской организации циркулируют те или иные микроорганизмы, которые представляют собой угрозу развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) у пациентов. Уровень колонизации ими больничных объектов при бактериологических методах исследования составляет от 5 до 36%, однако эти тесты не всегда помогают определить пути передачи инфекции. Дополнительную информацию можно получить с помощью молекулярно-генетических методов (полимеразной цепной реакции в реальном времени, ПЦР-РВ), однако их роль в системе эпидемиологического надзора в стационаре пока не определена.

Проведен сравнительный анализ бактериологических методов и ПЦР-РТ при проведении эпидемиологического надзора за ИСМП в стационаре. Исследованы 215 проб смывов с объектов внутрибольничной среды, а также 53 пробы клинического материала, полученные от пациентов (локусы: зев, нос, кишечник) и сотрудников (локусы: зев, нос). Микробная обсемененность объектов внутрибольничной среды составила 54,0% при проведении бактериологического исследования. При проведении ПЦР-РТ ДНК микроорганизмов на тех же объектах обнаружены в 80,0%. Между частотой выделения микроорганизмов и ДНК микроорганизмов в различных отделениях выявлена сильная прямая корреляционная связь ($r = 0,92$). Совпадение результатов при двух методах исследования в большинстве случаев отмечалось при высоких значениях копий ДНК (800-10000). При молекулярно-генетическом методе диагностики в 1,9 раз чаще выявлялись гены метициллин-резистентных стафилококков (MRS) и в 26,0% смывов обнаружены гены металло- β -лактамазы (МБЛ), продуценты которых при бактериологических исследованиях не найдены.

У всех пациентов онкологического профиля при поступлении хотя бы из одного локуса, где были найдены стафилококки, выделен ген *mecA*. При выписке количество микроорганизмов, присутствующих в образцах биоматериала, из которых выделялся *mecA* увеличилось в 1,4 раза.

Использование ПЦР-РТ помогло установить эпидемиологическую связь циркулирующих в определенном отделении микроорганизмов, в частности *S.aureus* и коагулазонегативных стафилококков. Кроме того, с помощью этих тестов выявлены гены МБЛ и других карбапенемаз в образцах от сотрудников и с объектов внутрибольничной среды.

Ключевые слова: эпидемиологический надзор, молекулярно-генетическая диагностика, полимеразная цепная реакция в реальном времени, инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи.

Введение

Стратегической задачей здравоохранения является обеспечение качества медицинской помощи и создание безопасной среды пребывания для пациентов и персонала в организациях, осуществляющих медицинскую деятельность [1].

В каждой медицинской организации циркулируют те или иные микроорганизмы, которые представляют собой угрозу развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) у пациентов. Уровень колонизации ими больничных объектов при бактериологических методах исследования составляет от 5 до 36%

METHODS OF MOLECULAR GENETIC DIAGNOSTICS IN THE SYSTEM OF EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE IN THE HOSPITAL

Orlova O.A.^{1,2}, Zamyatin M.N.¹, Umzunova N.A.¹, Lashenkova N.N.¹, Akimkin V.G.², Savochkina Yu.A.*², Skachkova T.S.²

¹ Federal State Public Institution «National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

² Federal Budget Institution of Science «Central Research Institute of Epidemiology» of The Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance

Abstract. Microorganisms that pose a threat of development of infections associated with healthcare (HAI) are present in every hospital. According to bacteriological tests, the level of colonization by nosocomial microorganisms of hospital facilities is from 5 to 36%, however, these tests do not always help to determine the pathways of infection. Additional information can be obtained from real time polymerase chain reaction (RT-PCR) tests, but their place in the system of epidemiological survey in the hospital has not yet been determined.

Objective: to conduct a comparative study of bacteriological and RT-PCR tests results as part of epidemiological survey of HAI in the hospital. Materials and methods: 215 samples of washout from the objects of the hospital environment, as well as 53 samples of clinical material obtained from patients (loci: pharynx, nose, intestine) and employees (loci: pharynx, nose) were studied. Results and discussion: microbial contamination of objects in the hospital environment was 54.0% during bacteriological examination. RT-PCR found DNA of microorganisms at the same objects in 80.0%. The direct correlation between the detection frequency of microorganisms and the DNA of microorganisms was strong ($r=0.92$). The coincidence of the results of the two methods of research in most cases was noted at high values of DNA copies (800-10000). The RT-PCR revealed genes of methicillin-resistant staphylococci (MRS) 1.9 times more often, and the genes of metal- β -lactamase (MBL) were found in 26.0% of washout samples, where the bacteriological studies did not find the producers of such genes.

At admission in all cancer patients staphylococci had the gene *mecA* at least in one of the loci. At discharge, the number of microorganisms present in biomaterial samples, of which *mecA* was isolated, increased by 1.4 times.

The use of RT-PCR helped to establish the epidemiological relationship of circulating in a particular Department of the hospital of microorganisms, such as *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci. In addition, these tests revealed the genes of MBL and other carbapenemases in samples from employees and from the facilities of the hospital environment.

Keywords: epidemiological surveillance, molecular genetic tests, real time polymerase chain reaction, nosocomial microorganisms, infections associated with healthcare.

[2; 3], однако эти тесты не всегда помогают определить пути передачи инфекции.

Дополнительную информацию можно получить с помощью молекулярно-генетических методов, в частности метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Молекулярно-генетические методы широко используются при диагностике традиционных инфекционных заболеваний (вирусные гепатиты, инфекции, передающиеся половым путем и др.), в том числе для выявления источников инфекции и факторов передачи возбудителя во время эпидемических вспышек. Однако в случае развития ИСМП

* e-mail: savochkina@pcr.ru

эти методы используют очень редко. Между тем в настоящее время ИСМП превратились в одну из глобальных проблем, несущих максимальную угрозу человечеству. В основе этих проблем лежит широкое распространение устойчивости возбудителей ИСМП к лекарственным препаратам [4].

Современные исследования рекомендуют использование методов молекулярно-генетической диагностики при проведении эпидемиологического надзора за ИСМП, в т.ч. и микробиологического мониторинга за циркулирующей в стационаре микрофлорой, однако пока эти рекомендации носят больше теоретический характер и не определяют место этих методов в систем эпидемиологического надзора в стационаре [5–7]. Нужны дальнейшие исследования, направленные на изучение чувствительности, специфичности и диагностической значимости методов молекулярно-генетической диагностики в сравнении с классическим бактериологическим анализом.

Цель исследования: сравнительный анализ бактериологических и молекулярно-генетических методов при проведении эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентными микроорганизмами в стационаре.

Материалы и методы

Проведено комплексное лабораторное обследование пациентов отделения гематологии при поступлении и выписке, сотрудников одного из отделений, а также объектов внутрибольничной среды хирургических, реанимационных, гематологических отделений крупного многопрофильного стационара.

Проведено исследование 215 проб смывов с объектов внутрибольничной среды, а также 53 проб клинического материала, полученных от пациентов (локусы: зев, нос, кишечник) и сотрудников (локусы: зев, нос). Пробы брались с наиболее значимых в эпидемиологическом плане объектов: руки и спецодежда медицинского персонала, телефонных аппаратов, клавиатуры компьютера, кнопок перфузора, ручек дозаторов, мониторов аппаратов ИВЛ, манипуляционных столиков, дверных ручек, спинок кроватей пациентов, штативов для внутривенных инфузий, консолей.

Забор биологического материала от пациента для бактериологического исследования проводили на полужидкие транспортные среды «Артаса», кровь в одноразовые флаконы «Bactec». Идентификацию микроорганизмов проводили с использованием автоматического микробиологического анализатора «Vitek-2», крови – автоматического микробиологического анализатора «Bactec 9050».

Смывы с объектов внутрибольничной среды проводили с использованием традиционных питательных сред (мясо-пептонный бульон, среды Эндо, Вильсон-Блер, псевдомонадный агар, манитолагар, среда Сабуро). Для идентификации микроорганизмов использовали автоматический микробиологический анализатор «Vitek-2».

Выявление в образцах биоматериала ДНК основных бактериальных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и генетических детерминант их антибиотикорезистентности проводили

методом мультиплекстной ПЦР-РВ с использованием методик и наборов реагентов, разработанных ЦНИИ эпидемиологии. Использованные методики и наборы реагентов основаны на ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с помощью флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов. ПЦР-исследование выполнялось с помощью систем для проведения ПЦР-РВ RotorGene Q и CFX96 Touch. Экстракцию ДНК из образцов биоматериала (мазков со слизистых оболочек зева, носа, прямой кишки или смывов с объектов внутрибольничной среды) проводили с использованием комплектов реагентов «РИБО-преп».

Для выявления ДНК *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* и *Enterococcus spp.* использовали методику, включающую два мультиплексных ПЦР-РВ-теста, позволяющие детектировать специфические фрагменты ДНК возбудителей инфекций каждого из выявляемых видов или групп бактерий по отдельному каналу флуоресцентной детекции. Для выявления генов приобретенных карбапенемаз основных групп – металло-бета-лактамаз (MBL) групп VIM, NDM и IMP, карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных – у основных грам-отрицательных возбудителей инфекций использовали наборы реагентов «АмплиСенс® MDR-MBL-FL» и «АмплиСенс® MDR-KPC/OXA-48 -FL». Также проводили ПЦР-РВ-тест для выявления генов OXA-карбапенемаз ацинетобактеров (групп OXA-40-, OXA-58- и OXA-23-подобных). Для выявления ДНК метициллин-резистентных стафилококков (как MRSA, так и MRCNS) и идентификации ДНК *Staphylococcus aureus* использовали набор реагентов «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL».

Рассчитывались: интенсивные показатели частоты выделения микроорганизмов, экстенсивные показатели распределения структуры выделенных микроорганизмов, коэффициент линейной корреляции между выделением микроорганизмов и ДНК микроорганизмов, достоверность различий показателей оценивали с использованием критерия Стьюдента (t).

Результаты и обсуждение

За период проведения исследования микробная обсемененность объектов внутрибольничной среды составила 54% при проведении бактериологического исследования. В 80% случаев обнаружены ДНК микроорганизмов при проведении молекулярно-генетического исследования. Между частотой выделения микроорганизмов и ДНК микроорганизмов в различных отделениях выявлена сильная прямая корреляционная связь ($r = 0,92$).

Бактериологическим методом обнаружено 129 микроорганизмов, с преобладанием коагулазонегативных стафилококков – 91 (70,5%). Молекулярно-генетическим методом обнаружено 288 ДНК микроорганизмов с преимущественным выделением ДНК коагулазонегативных стафилококков – 160 (55,6%), *Streptococcus spp.* – 57 (19,8%) и *Enterococcus spp.* – 48 (16,7%) (Рис. 1).

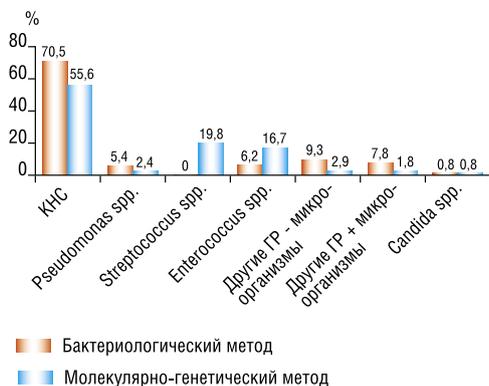


Рис. 1. Структура выделенных микроорганизмов

Микроорганизмы и ДНК микроорганизмов выделяли как в изолированном виде, так и в виде ассоциаций. Достоверно чаще ассоциации микроорганизмов выявлялись при молекулярно-генетическом методе 30,9% против 13,5% – при бактериологическом методе ($p < 0,05$).

В ассоциациях микроорганизмов наиболее часто встречались сочетания КНС с *Enterococcus* spp. – 33,3% и КНС с *Pseudomonas* spp. – 27,8%. При молекулярно-генетическом исследовании чаще всего обнаруживались следующие сочетания ДНК микроорганизмов – КНС и *Streptococcus* spp. – 24,7%, КНС и *Enterococcus* spp. – 14,6% и КНС, *Streptococcus* spp. и *Enterococcus* spp. – 39,3%.

Частота выделения эпидемиологически значимых микроорганизмов, относящихся к группе ESCAPE, составила 22,7% при бактериологическом методе и 41,3% – при молекулярно-генетическом методе ($p < 0,05$). Наиболее часто выделялись *Enterococcus* spp. 6,0% и 16,7%, а также *Staphylococcus aureus* 2,6% и 3,1%, соответственно (Рис. 2).

Достоверно чаще при молекулярно-генетическом методе исследования обнаруживали ген *mecA* (устойчивости к метицилину) у *Staphylococcus* spp. – 58,1%, чем при бактериологическом исследовании, выявляли метициллин-резистентные стафилококки (MRS) – 30,0% ($p < 0,05$).

Также при молекулярно-генетическом методе исследования в 19,4% случаев были выявлены гены металло- β -лактамазы, (VIM, NDM, IMP), тогда как при бактериологическом методе микроорганизмы, потенциальные продуценты металло- β -лактамаз выявлены не были ($p < 0,05$).

Наиболее часто встречаемым микроорганизмом при двух методах исследования являлся КНС. При этом частота его выявления была различна. Совпадение результатов в двух методов исследования отмечалось только в 65 случаях. В остальных случаях отмечалось несовпадение результатов, при этом положительные результаты бактериологических исследований и отрицательные молекулярно-генетических исследований отмечалось в 26 случаях, отрицательные результаты бактериологических исследований и положительные молекулярно-генетических исследований отмечалось в 95 случаях.

Совпадение результатов при двух методах исследования в большинстве случаев отмечалось при высоких зна-

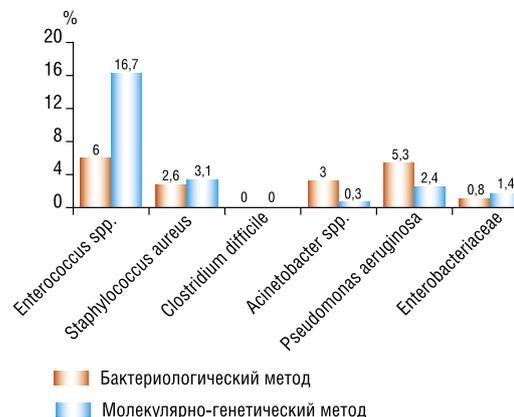


Рис. 2. Частота выделения микроорганизмов группы ESCAPE

чениях копий ДНК (800–10000). Чаще всего несовпадение результатов (отрицательные результаты бактериологических исследований и положительные молекулярно-диагностических исследований) отмечалось при низких значениях копий ДНК микроорганизмов и наличии микробных ассоциаций.

При обследовании пациентов онкологического профиля молекулярно-генетическим методом обнаружено в 1,8–2,1 раза больше микроорганизмов, чем при использовании бактериологического метода ($p < 0,05$) (Рис. 3).

У всех пациентов при поступлении выделен ген *mecA* у *Staphylococcus* spp., присутствовавший в образцах биоматериала, хотя бы из одного локуса. При выписке количество микроорганизмов, присутствовавших в образцах биоматериала, из которых выделялся *mecA*, увеличилось в 1,4 раза ($p < 0,05$).

Клиническое значение этих данных пока остается неизвестным, но они требуют внимания, так как несут потенциальные риски недостаточной эффективности профилактических мероприятий.

При проведении одновременного исследования проб биологического материала от пациентов и сотрудников одного из отделений, а также смывов с объектов в палатах классическим бактериологическим методом эпидемиологическая обстановка была относительно благополучной, частота положительных результатов находилась в пределах допустимых значений, явные признаки связи между микроорганизмами, высеваемыми из разных локусов отсутствовали. Наиболее часто высеивались стафилококки – *S. aureus* и КНС (Рис. 4). Однако при использовании ПЦР-РВ картина оказалась иной, были обнаружены признаки циркуляции микроорганизмов между пациентами и сотрудниками и колонизация этими же микроорганизмами объектов внутрибольничной среды (Рис. 5).

Выявлена достоверно более высокая частота присутствия резистентных штаммов стафилококков, с равной вероятностью обнаруживаемых не только у пациентов, но и у сотрудников отделения и на объектах больничной среды. Кроме того, при ПЦР-РВ материалов, полученных от сотрудников и с объектов больничной среды, найдены

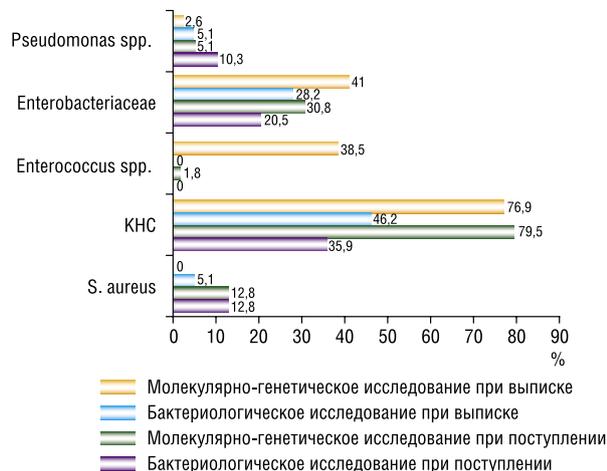


Рис. 3. Структура наиболее часто выделяемых микроорганизмов у пациентов онкологического профиля



Рис. 4. Структура микроорганизмов, выделенных бактериологическим методом



Рис. 5. Структура микроорганизмов и гены антибиотикорезистентности, выделенные молекулярно-генетическим методом

гены МБЛ и других карбапенемаз. Следует отметить, что метод ПЦР-РВ не позволяет ответить на вопрос о том, принадлежат ли обнаруженные в смывах с объектов больницы гены резистентности живым или мертвым микроорганизмам и, соответственно, однозначно признать факт выявления путей распространения резистентных штаммов эпидемиологически значимых микроорганизмов и путей передачи механизмов антибиотикорезистентности.

Однако в любом случае, наличие на поверхности объектов внутрибольничной среды генов резистентных микроорганизмов свидетельствует о наличии больших резервов для мероприятий инфекционного контроля. Кроме того, применение молекулярно-генетического метода позволяет выявлять циркуляцию значимых микроорганизмов в отделениях высокого эпидемиологического риска и отслеживать формирование «госпитальных» штаммов.

Заключение

Очевидно, что комплексное использование бактериологических и молекулярно-генетических методов при проведении микробиологического мониторинга за антибиотикорезистентными микроорганизмами более эффективно, чем классический бактериологический мониторинг. Молекулярно-генетический метод обладает большей чувствительностью при небольших количествах микроорганизмов на объектах внутрибольничной среды и позволяет выявлять гены антибиотикорезистентности, что может помочь решению задач эпидемиологического надзора в стационаре.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Онищенко, Г.Г. Национальная Концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 6 ноября 2011 г.). <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70000121/#ixzz310bdk4M>. [Onishchenko, G.G. Nacional'naja koncepcija profilaktiki infekcij, svyazannyh s okazaniem medicinskoj pomoshhi (utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 6 nojabrja 2011 g.). <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70000121/#ixzz310bdk4M>].
2. Орлова, О.А., Акимкин, В.Г. Микробиологический пейзаж отделения хирургической реанимации. Дезинфекционное дело. 2014; 4 (90): 53-58. [Orlova, O.A., Akimkin, V.G. Mikrobiologicheskij pejzaz otdelenija hirurgicheskoj reanimacii. Dezinfekcionnoe delo. 2014; 4 (90): 53-58].
3. Захарова, Ю.А. Совершенствование эпидемиологического надзора за гнойно-септическими инфекциями в акушерских стационарах на основе оптимизации эпидемиологического и микробиологического мониторингов. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Пермь; 2009. [Zaharova, Ju.A. Sovershenstvovanie jepidemiologicheskogo nadzora za gnojno-septicheskimy infekcijami v akusherskih stacionarah na osnove optimizacii jepidemiologicheskogo i mikrobiologicheskogo monitoringov. Avtoref. dis. ... d-ra med. nauk. Perm'; 2009].
4. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillance-report/en/>. [Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillance-report/en/>].
5. Покровский, В.И., Акимкин, В.Г., Брико, Н.И., Брусина, Е.Б., Зуева, Л.П., Ковалишена, О.В. Внутрибольничные инфекции: новые горизонты профилактики. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2011; 1: 4-7. [Pokrovskij, V.I., Akimkin, V.G., Briko, N.I., Brusina, E.B., Zueva, L.P., Kovalishena, O.V. Vnutribol'nichnye infekcii: novye gorizonty profilaktiki. Jependiologija i infekcionnye bolezni. 2011; 1: 4-7].
6. Гончаров, А.Е. Молекулярно-генетический мониторинг за эпидемическими клонами Staphylococcus aureus и Acinetobacter baumannii в системе эпидемиологического надзора за внутрибольничными инфекциями дис. док. мед. наук. 2017. [Goncharov, A.E. Molekuljarno-geneticheskij monitoring za jepidemicheskimi klonami Staphylococcus aureus i Acinetobacter baumannii v sisteme jepidemiologicheskogo nadzora za vnutribol'nichnymi infekcijami dis. dok. med. nauk. 2017].
7. Федеральные клинические рекомендации. Молекулярно-генетический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. 2015. http://nasci.ru/_resources/directory/198/common/20-14_8_Molec_monitoring_new.pdf. [Federal'nye klinicheskie rekomendacii. Molekuljarno-geneticheskij monitoring v sisteme jepidemiologicheskogo nadzora za infekcijami, svyazannyimi s okazaniem medicinskoj pomoshhi. 2015. http://nasci.ru/_resources/directory/198/common/2014_8_Molec_monitoring_new.pdf].