

УДК 616-006.04: 616.9-022-078

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**¹Зыкова Т.А., ¹Шевченко А.Н., ¹Хомутенко И.А., ¹Панова Н.И., ¹Богомолова О.А.,
¹Алавердян И.А., ²Савочкина Ю.А.***¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: tatiana2904@yandex.ru;**²ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, e-mail: savochkina@pcr.ru*

В работе представлены результаты исследований клинического материала (моча, плевральная жидкость, раневое отделяемое, ликвор) при развитии инфекционных осложнений у онкологических больных. Сравнивали эффективность исследований, выполненных с использованием классического культурального и метода ПЦР-РВ. Частота полного совпадения результатов исследований для образцов мочи составила 66,6%, образцов раневого отделяемого – 58,5%. В случаях развития ИМП при использовании ПЦР-РВ различные патогены были обнаружены в 2,15 раза чаще, чем при использовании классического культурального метода, а при раневых инфекциях в 2,21 раз чаще. Метод молекулярной детекции показал большую эффективность по сравнению с культуральным, позволил быстрее получить результат и может быть рекомендован в случаях необходимости принятия срочного решения о проведении антибиотикотерапии.

Ключевые слова: ПЦР-РВ, молекулярная детекция, инфекционные осложнения, методы исследований**EXPERIENCE IN THE USE OF MOLECULAR TECHNIQUES IN DIAGNOSIS OF INFECTIOUS COMPLICATIONS IN CANCER PATIENTS****¹Zykova T.A., ¹Shevchenko A.N., ¹Khomutenko I.A., ¹Panova N.I., ¹Bogomolova O.A.,
¹Alaverdyan I.A., ²Savochkina Y.A.***¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: tatiana2904@yandex.ru;**²Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, e-mail: savochkina@pcr.ru*

The article presents the results of a study of clinical material (urine, pleural fluid, wound discharge and cerebrospinal fluid) in oncological patients developing infectious complications. Effectiveness of examinations performed using classical culture method and Real-Time PCR was compared. The both methods demonstrated identical results in 66,6% for urine samples and in 58,5% for wound discharge samples. RT-PCR allowed detection of various pathogens 2,15 times more often in patients with urinary tract infections in comparison with the classical culture method, and 2,21 times more often in patients with wound infections. The method of molecular detection was shown to be more effective than the cultural one; it allowed getting quick results and can be recommended in the need for urgent decisions concerning antibiotic therapy.

Keywords: Real-Time PCR, molecular detection, infectious complications, methods of examination

Онкологические больные относятся к особой группе риска в отношении развития инфекционных осложнений. Это связано как с дефектами иммунной системы, так и многочисленными инвазивными манипуляциями, длительными госпитализациями, многократными курсами химиолучевой терапии, агрессивной антимикробной терапией [5].

Успешное разрешение проблемы инфекционных осложнений у онкологических больных состоит как в их предупреждении, так и в этиологически оправданном и своевременном лечении. Для назначения этиотропной терапии необходима быстрая и точная идентификация этиологического агента инфекционного осложнения, а это диктует необходимость использования высокочувствительных и высокоспецифичных экспресс-методов диагностики.

Несмотря на широкое внедрение в работу микробиологических лабораторий новых

автоматизированных систем для идентификации и определения чувствительности микроорганизмов классические культуральные методы не всегда бывают достаточно чувствительными. К недостаткам классических методов относится их длительность, особенно для медленно растущих патогенов, невозможность детекции некультивируемых микроорганизмов, влияние антибактериальной терапии на результаты анализа. Этим недостаткам лишены молекулярные методы, позволяющие осуществлять прямую идентификацию возбудителя в первичном клиническом материале.

Наиболее распространенными в клинической практике микробиологических исследований являются различные модификации ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [6]. Этот метод давно и успешно применяется в ряде областей лабораторной медицины, в частности для диагностики ин-

фекций, передающихся половым путем, вирусных гепатитов. Однако в широкой практике микробиологических исследований других воспалительных заболеваний, в частности инфекций мочевых путей (ИМП) и раневых инфекций этот метод используется редко. В отдельных публикациях представлены результаты применения ПЦР-РВ для диагностики сепсиса и инфекционных осложнений у больных, находящихся в критическом состоянии [7, 8], ИМП [1]. В свете изложенного сопоставление результатов исследований, полученных с использованием классического культурального и молекулярного метода идентификации микроорганизмов, при развитии инфекционных осложнений у онкологических больных представляет актуальную задачу.

Цель исследования. Сравнительная оценка эффективности ПЦР в реальном времени и классического культурального метода в диагностике инфекционных осложнений у онкологических больных.

Материалы и методы исследования

Исследовано 55 образцов биологического материала, в том числе 33 образцов мочи, 8 образцов плевральной жидкости и 14 образцов отделяемого послеоперационной раны. Один и тот же образец изучали с помощью классического культурального метода и методик, разработанных ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. При использовании культурального метода видовую принадлежность изолированных штаммов и определение чувствительности определяли с помощью автоматической системы VITEK 2 (bioMérieux, Франция).

Экстракцию ДНК из клинического материала проводили с использованием набора реагентов «Рибо-преп» производства ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в соответствии с инструкцией производителя в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL). Предварительно 1 мл образца мочи центрифугировали при 11000g в течение 10 минут, надосадочную жидкость удаляли, к осадку добавляли 300 мкл лизирующего раствора. Далее процедура выделения ДНК соответствовала методике производителя. ДНК из образцов плевральной жидкости и раневого отделяемого выделяли без предварительной обработки.

Для обнаружения ДНК микроорганизмов использовали три методики ЦНИИЭ: «АмплиСенсЭнтеробактерии/G(+)» для определения ДНК семейства (*Enterobacteriaceae spp.*), стафилококков (*Staphylococcus spp.*), стрептококков (*Streptococcus spp.*) и энтерококков (*Enterococcus spp.*), «АмплиСенсG(-)Ab/Kp/Pa/Ec-Fl» для определения ДНК *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и «АмплиСенс®ФлороЦеноз/Кандиды-Fl» для определения ДНК грибов рода *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*. Все методики основаны на использовании мультиплексной ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени. Для выполнения количественного анализа

проводили одновременную амплификацию с детекцией для образцов ДНК, полученных из клинического материала и ДНК-калибраторов. Количество ДНК обнаруженных микроорганизмов в образцах биологического материала рассчитывали в геномных эквивалентах/мл (ГЭ/мл).

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ полученных данных показал, что нестерильными по результатам культурального исследования оказалось 39,4% образцов мочи, 12,5% плевральной жидкости и 53,8% раневого отделяемого.

При исследовании этого же клинического материала методом ПЦР-РВ положительными были 60,6% образцов мочи, 62,5% образцов плевральной жидкости и 69,2% образцов отделяемого операционной раны. Всего при классическом микробиологическом исследовании мочи было изолировано 16 культур микроорганизмов из 13 образцов (39,4%), в ПЦР выявлена ДНК 28 микроорганизмов в 20 образцах (60,6%).

При сопоставлении результатов исследования образцов мочи, полученных разными методами, из анализа были исключены образцы с количеством менее 10^3 ГЭ/мл (в ПЦР). Полное совпадение результатов отмечено в 28 случаях (66,6%). В двух случаях в ПЦР был получен отрицательный результат при положительных результатах посевов (*E. faecalis* 10^6 КОЕ/мл и *E. coli* 10^8 КОЕ/мл). В 12 случаях (28,6%) при отрицательных результатах посевов в ПЦР был обнаружен генетический материал возбудителей ИМП (табл. 1). Уровень обсемененности при этом составил 10^3 ГЭ/мл (7 образцов), 10^4 ГЭ/мл (2 образца), 10^5 ГЭ/мл (2 образца) и 10^7 ГЭ/мл (один образец).

Дискордантные результаты, на наш взгляд, можно объяснить как большей чувствительностью метода, так и возможностью определения ДНК погибших микроорганизмов, т.к. многие пациенты на момент обследования получали антибактериальные препараты.

В этиологической структуре ИМП у онкологических больных при поступлении в стационар преобладали традиционные уропатогены: *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *Kl. pneumoniae* (табл. 2). Однако ранговые значения различных патогенов при исследовании культуральным и молекулярным методом отличались. Так, при исследовании классическим методом чаще других была обнаружена *Kl. pneumoniae*, затем *Enterococcus spp.* и *E. coli*. При исследовании методом ПЦР-РВ чаще других была обнаружена ДНК *E. coli*, реже *Kl. pneumoniae* и *Enterococcus spp.* Моноинфекция была

обнаружена в 10 случаях (76,9% от положительных образцов) при исследовании культуральным методом и в 12 случаях (60,0%) при исследовании методом ПЦР. Помимо рассмотренных случаев в двух образцах была обнаружена ДНК *Ps.aeruginosa* и в одном образце *A.baumannii* с уровнем обсемененности 10^2 ГЭ/мл. *Ps.aeruginosa*, *A.baumannii*, *Streptococcus spp.* и грибы рода *Candida* были обнаружены только при использовании метода ПЦР.

В связи с этим на наш взгляд, в случае широкого использования ПЦР в рутинной практике необходимо продумать вопрос о правомочности автоматического переноса критериев интерпретации клинической значимости результатов, полученных с использованием культурального метода на метод молекулярный. В рассматриваемых случаях пациентам предстояло оперативное вмешательство на мочевом пузыре с трансуретральным доступом. И может быть, с учетом характера предстоящего вмешательства, целесообразно установить более тщательное наблюдение или дополнительное обследование пациентов с низким содержанием ДНК клинически значимых микроорганизмов в образцах мочи для своевременного выяв-

ления и адекватной терапии ранних послеоперационных осложнений.

Всего при классическом микробиологическом исследовании отделяемого послеоперационной раны и плевральной жидкости было изолировано 14 культур микроорганизмов в 8 образцах, в ПЦР обнаружена ДНК 31 микроорганизма в 13 образцах.

Полное совпадение результатов отмечено в 58,5% случаев (табл. 3). В 41,5% случаев генетический материал различных микроорганизмов был обнаружен в ПЦР и не обнаружен при посеве. При этом только в 7 образцах (41,2%) количество ДНК было в пределах 10^4 - 10^7 ГЭ/мл, в 10 (58,8%) случаях ДНК возбудителей бактериальных инфекций была обнаружена в количестве 10^3 ГЭ/мл.

В этиологической структуре возбудителей инфекционных осложнений при исследовании классическим культуральным методом преобладали *Enterococcus spp.*, *Ps. aeruginosa*, *E. coli* и *A.baumannii* (табл. 4). При исследовании методом ПЦР-РВ чаще других была обнаружена ДНК *E. coli*, далее по мере уменьшения *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* и *Ps. aeruginosa*. *Streptococcus spp.* и грибы рода *Candida* были обнаружены только методом ПЦР.

Таблица 1

Результаты параллельных исследований образцов мочи культуральным и молекулярным методом

	Количество проб/ микроорганизмов (абс)	Количество проб/ микроорганизмов (%)
Отрицательные в ПЦР и при посеве (образцы)	14	33.3
Положительные в ПЦР и при посеве (выявленные микроорганизмы)	14	33.3
Отрицательные в ПЦР и положительные при посеве (выявленные микроорганизмы)	2	4.8
Положительные в ПЦР и отрицательные при посеве (выявленные микроорганизмы)	12	28.6
Всего	42	100.0

Таблица 2

Структура возбудителей ИМП у онкологических больных при исследовании культуральным и молекулярным методом

Микроорганизмы	По результатам посева		По результатам ПЦР	
	Абс.	%	Абс.	%
<i>Kl. pneumoniae</i>	6	37,5	7	25,0
<i>E. faecalis</i> (<i>Enterococcus spp.*</i>)	5	31,25	6	21,4
<i>E. coli</i>	4	25,0	8	28,6
<i>S. epidermidis</i> (<i>Staphylococcus spp.*</i>)	1	6,25	2	7,1
<i>Streptococcus spp.*</i>	–	–	3	10,7
<i>C. glabrata</i>	–	–	2	7,1
Всего культур	16	100,0	28	100,0

Примечание. *ПЦР.

Таблица 3

Результаты параллельных исследований образцов раневого отделяемого и плевральной жидкости культуральным и молекулярным методом

	Количество проб/ микроорганизмов (абс)	Количество проб/ микроорганизмов (%)
Отрицательные в ПЦР и при посеве (образцы)	10	24.4
Положительные в ПЦР и при посеве (выявленные микроорганизмы)	14	34.1
Положительные в ПЦР и отрицательные при посеве (выявленные микроорганизмы)	17	41.5
Всего	41	100.0

Таблица 4

Структура возбудителей инфекционных осложнений у онкологических больных при исследовании культуральным и молекулярным методом

Микроорганизмы	По результатам посева		По результатам ПЦР	
	Абс.	%	Абс.	%
<i>E. faecalis</i> (<i>Enterococcus</i> spp.*)	4	28.6	7	22.6
<i>Ps. aeruginosa</i>	4	28.6	4	12.9
<i>E. coli</i>	3	21.4	9	29.0
<i>A.baumannii</i>	2	14.3	3	9.7
<i>S.epidermidis</i> (<i>Staphylococcus</i> spp.*)	1	7.1	6	19.4
<i>Streptococcus</i> spp.*	-	-	1	3.2
<i>C. glabrata</i>	-	-	1	3.2
Всего культур	14	100.0	31	100.0

Примечание. *ПЦР.

Результаты исследований показали, что молекулярный метод детекции оказался более эффективным, чем классический культуральный. В случаях развития ИМП при использовании ПЦР-РВ различные патогены в клинически значимом количестве были обнаружены в 2,15 раза чаще (28 патогенов против 13), чем при использовании классического культурального метода, а при раневых инфекциях в 2,21 раз чаще (31 патоген против 14).

К недостаткам молекулярного метода относится возможность детекции только определенных, наиболее распространенных возбудителей бактериальных инфекций. В этом случае перед исследователем каждый раз стоит вопрос выбора определяемых патогенов в зависимости от задачи исследования и вида клинического материала (моча, ликвор, кровь, отделяемое раны). В условиях большого потока клинического материала трудно будет унифицировать подобные исследования. Другим недостатком молекулярного метода является невозможность определения чувствительности к конкретным антимикробным препаратам. Однако на отечественном рынке реагентов для *in vitro* диагностики уже до-

ступны наборы для определения генов карбапенемаз и β -лактамаз. Ряд исследователей сообщали об опыте использования этих наборов [9]. Результаты изучения распространения генов резистентности у представителей семейства *Enterobacteriaceae*, *A.baumannii*, *MRSA* в онкологическом стационаре были также опубликованы нами ранее [3, 4, 10, 11].

Использование молекулярной детекции для этиологической диагностики ИМП и раневых инфекций значительно сокращает время анализа, что, в свою очередь, позволяет клиницистам принимать своевременные и обоснованные решения по терапии инфекционных осложнений у иммунокомпроментированных пациентов.

Классические микробиологические и молекулярные методы идентификации возбудителей инфекционных заболеваний не являются взаимозаменяемыми, но лишь дополняют друг друга. Учитывая скорость развития инфекционного процесса у онкологических больных исследования, проведенные с привлечением молекулярных методов, на наш взгляд, могут служить эффективным инструментом для своевременного выявления проблемных

микроорганизмов, в том числе штаммов, несущих генетические детерминанты резистентности.

Выводы

Молекулярные методы являются более эффективными, позволяют быстро получить результат и могут быть рекомендованы в случаях необходимости принятия срочного решения о проведении или коррекции антибиотикотерапии с учетом данных локального микробиологического мониторинга.

Список литературы

1. Аминев Р.А., Билалов Ф.С., Шарафутдинов Н.Х. Организация молекулярной диагностики инфекций мочевыводящих путей // Молекулярная диагностика 2014: сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции, – Москва, 2014. – Т. 1. – С. 261–262.
2. Зыкова Т.А., Богомолова О.А., Панова Н.И., Малейко М.Л., Бут О.А. Выявление генов ОХА-карбапенемаз у изолятов *Acinetobacter baumannii*, выделенных в стационарах Ростова-на-Дону // Молекулярная диагностика 2014: сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции, – Москва, 2014. – Т. 1. – С. 273.
3. Зыкова Т.А., Богомолова О.А. Определение генов резистентности у грамотрицательных бактерий молекулярными методами // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т.16, №2, Приложение 1: тезисы XVI Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной химиотерапии. – С. 21.
4. Инфекции в онкологии/под ред. М.И. Давыдова, Н.В. Дмитриевой. – М.: Практическая медицина, 2009. – 472с. : ил.
5. Лопухов Л.В., Эйдельштейн М.В. Полимеразная цепная реакция в микробиологической практике // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т. 2. – № 3. – С. 96–106.
6. Припутневич Т.В. и др. Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т. 16. – № 1. – С. 4–9.
7. Тихомиров Д.С., Туполева Т.А., Шипулина О.Ю., Савочкина Ю.А., Игнатова Н.Е., Галстян Г.М., Филатов Ф.П. Метод амплификации нуклеиновых кислот в диагностике бактериальных осложнений у больных в критическом состоянии // Молекулярная диагностика 2014: сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции, – Москва, 2014. – Т. 1. – С. 290–291.
8. Тихомиров Д.С., Катрыш С.А., Савочкина Ю.А., Гаранжа Т.А., Туполева Т.А., Филатов Ф.П., Галстян Г.М. Мультиплексная ПЦР как новый метод определения генов устойчивости карбапенемам // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т.59. – №1.: материалы II конгресса гематологов России. – С. 123.
9. Zykova T., Bogomolova O., Savochkova Y. Molecular methods in epidemiologic monitoring of hospital microflora. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, Denmark 25-28 April 2015, P0835.
10. Tatiana A. Zykova, Michail L. Maleyko, Olga A. Bogomolova, Natalia I. Panova, Sergei A. Ilchenko, Vladimir A. Dontsov, Igor V. Goncharov. Frequency of methicillin-resistant staphylococcus aureus carriage state in patient of a cancer hospital. J Clin Oncol 2014 32, 2014 ASCO Annual Meeting, (suppl; abstr e 15086).