

УДК 579.84:615.3-07

М.Р. МАЗИТОВ, И.Р. ВАЛИУЛЛИНА, Л.Ю. КУЛАГИНА

Республиканская клиническая больница МЗ РТ, 420064, г. Казань, Оренбургский тракт, д. 138

Использование ПЦР в режиме реального времени для детекции генов резистентности проблемных грам-отрицательных бактерий

Мазитов Марат Рафаэлевич — главный специалист по диагностике, тел. (843) 237-31-58, e-mail: marat.mazitov@tatar.ru**Валиуллина Инна Робертовна** — заведующая лабораторией клинической бактериологии, тел. (843) 237-34-13, e-mail: innalife@yandex.ru**Кулагина Людмила Юрьевна** — заведующая отделением клинической фармакологии, тел. (843) 237-35-12, e-mail: kazanfarm@yandex.ru

Рост устойчивости к антимикробным препаратам у бактерий приводит к резкому снижению эффективности этиотропной терапии. Традиционные методы диагностики в микробиологии не доказывают наличие или отсутствие генов резистентности. Необходимо в рутинной практике более активно использовать современные методы определения генома микроорганизмов. В статье представлены результаты исследований генома 279 штаммов грам-отрицательных бактерий. Данное исследование необходимо проводить на регулярной основе для мониторинга за проблемными микроорганизмами и коррекции алгоритмов антибактериальной терапии в стационаре.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, молекулярно-генетический микробиологический мониторинг.

M.R. MAZITOV, I.R. VALIULLINA, L.Yu. KULAGINA

Republican Clinical Hospital of the MH of RT, 138 Orenburgskiy Tract, Kazan, Russian Federation, 420064

Using PCR in real time for the detection of resistance genes problematic gram-negative bacteria

Mazitov M.R. — Chief Specialist for diagnosis, tel. (843) 237-31-58, e-mail: marat.mazitov@tatar.ru**Valiullina I.R.** — Head of the Laboratory of Clinical Bacteriology, tel. (843) 237-34-13, e-mail: innalife@yandex.ru**Kulagina L.Yu.** — Head of the Department of Clinical Pharmacology, tel. (843) 237-35-12, e-mail: kazanfarm@yandex.ru

The growth of antimicrobial resistance in bacteria leads to a drastic reduction in the efficiency of causal treatment. Traditional methods of diagnosis in microbiology not prove the presence or absence of resistance genes. You must usually make greater use of modern methods for the determination of the genome of microorganisms. The article presents the results of studies of the genome 279 strains of gram-negative bacteria. This study should be carried out on a regular basis for monitoring of problem microorganisms and correction algorithms antibiotic therapy in the hospital.

Key words: antibiotic resistance, molecular genetic microbiological monitoring.

Определение антибиотикочувствительности микроорганизмов приобретает все большее значение в связи с появлением и широким распространением антибиотикорезистентности бактерий [1]. Клиницист, получая результат из лаборатории клинической бактериологии, ожидает увидеть там не только этиологически значимый микроорганизм, но и информативную антибиотикограмму к максимальному количеству антимикробных препаратов (АМП). В настоящее время невозможно протестировать микроорганизмы ко всем имеющимся препаратам. Поэтому в рутинной практике врачи-бактериологи определяют чувствительность к основным антибиотикам, результаты которых могут быть репрезентативны для целого класса антибиотиков. По сути, происходит работа по конструированию генотипа исследуемого штамма на основании полученной

антибиотикограммы. В условиях все возрастающей сложности механизмов резистентности и многочисленных вариантов их комбинаций у одного штамма значительно затрудняется считывание полученных результатов и прогнозирование эффективности антимикробной терапии.

Референтный метод оценки антибиотикочувствительности быстрорастущих аэробных бактерий — количественное определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) антимикробных препаратов [2]. Однако метод трудоемкий, финансово затратный и применение его в условиях лаборатории клинической бактериологии при медицинском учреждении затруднительно. В некоторых случаях значение МПК может не отражать истинную активность, поэтому интерпретация результатов испытаний с некоторыми антибактериальными препа-

Рисунок 1

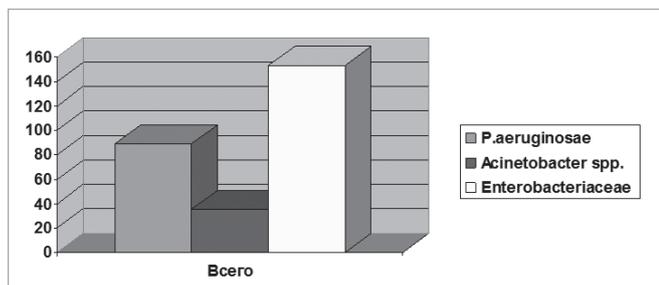
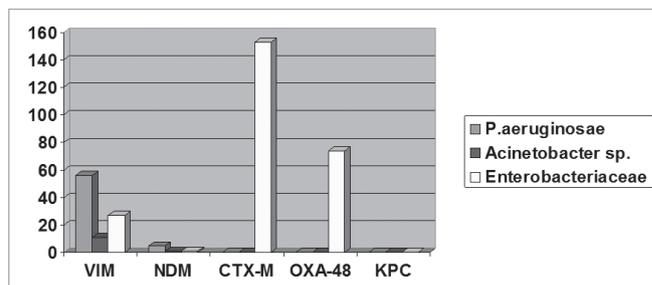


Рисунок 2



ратами для клинического применения, возможно, должна быть изменена. Например, метод микроразведений в бульоне не может надежно выявлять резистентность, опосредованную геном mecA [2].

Развитие и активное внедрение в медицинскую практику геномных и постгеномных технологий становится в настоящее время все более очевидным фактом. Это находит отражение и в принятой Правительством РФ «Стратегии развития медицинской науки в РФ до 2025 года», которая относит геномику, протеомику, эпигеномику и биоинформатику к числу приоритетных направлений развития медицины. Не вызывает сомнений также необходимость внедрения современных достижений молекулярной биологии в систему эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями. Молекулярно-генетический мониторинг позволяет выявить два основных процесса, которые могут привести к развитию эпидемически значимых событий. Во-первых, занос (завоз) возбудителя в популяцию риска извне и, во-вторых, направленную перестройку популяции возбудителя *in situ* (спонтанный генетический дрейф). Это применительно к эпидемиологии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), обозначает возможность выявления процессов формирования госпитальных штаммов и их эпидемического распространения за пределы стационара. В связи с данным обстоятельством в «Национальной концепции профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» особое внимание уделено методам молекулярно-генетического типирования микроорганизмов. В частности, в качестве мероприятий, направленных на совершенствование лабораторной диагностики и мониторинга возбудителей ИСМП предлагаются мероприятия направленные на «расшифровку геномактуальных возбудителей ИСМП, циркулирующих в учреждениях здравоохранения; создание референс-лабораторий, обеспечивающих проведение дорогостоящих и технически сложных исследований, включая молекулярно-генетическое типирование» [3].

Для идентификации генов резистентности штаммов, циркулирующих в стационаре, была инициирована научно-исследовательская работа совместно с отделом геномных и клеточных технологий института фундаментальной медицины и биологии при Поволжском федеральном университете (ПФУ).

Материал и методы

Отбирались фенотипически резистентные культуры и выделялась ДНК возбудителя. Для выделения ДНК использовался реагент «ДНК-экспресс» («Литех», РФ). Согласно рекомендациям изготовителя, полученный супернатант использовали для проведения определения генов резистентности методом полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РРВ). Для определения генов резистентности методом ПЦР-РРВ использовались наборы реактивов формата «ФЛУОРОПОЛ-РВ» комплектации «Нераскапанный» («Литех»):

- Резистентность к карбапенемам – 1 (Резистентность Enterobacteriaceae и Pseudomonas к карбапенемам. Выявление генов VIM);
- Резистентность к карбапенемам – 2 (Резистентность Enterobacteriaceae к карбапенемам. Выявление генов NDM);
- Резистентность к карбапенемам – 3 (Резистентность Enterobacteriaceae к карбапенемам. Выявление генов OXA-48);
- Резистентность к карбапенемам – 4 (Резистентность Enterobacteriaceae к карбапенемам. Выявление генов KPC);
- Резистентность к цефалоспорином – 1 (Резистентность Enterobacteriaceae к цефалоспорином. Выявление генов CTX-M);
- Резистентность к цефалоспорином – 2 (Резистентность Staphylococcus aureus к цефалоспорином. Выявление генов MecA);
- Резистентность к гликопептидам (Резистентность Enterococcus faecalis и E. faecium к ванкомицину и тейкопланину. Выявление генов VanA и VanB) [4].

Таблица

Микроорганизмы	Кол-во	VIM	%	CTX-M	%	OXA48	%	NDM	%
P.aeruginosae	89	56	62.9	0	0	0	0	0	0
Acinetobacter spp.	35	11	31.4	0	0	0	25	1	2.8
Enterobacteriaceae	153	27	17.6	153	100	74	43.7	0	0
Итого	279	94		153		74		1	

Параллельно с анализируемыми образцами проводились реакции с отрицательным и положительным контролем. Анализ результатов амплификации проводился с помощью программы Bio Rad CFX Manager 3.0 согласно «Руководству по применению наборов формата ФЛУОРОПОЛ-РВ».

Результаты

Были проанализированы 279 фенотипически резистентных культур, выделенных от пациентов крупных лечебных учреждений. В анамнезе данных пациентов отмечена массивная антибактериальная терапия при предыдущих госпитализациях, оперативные вмешательства, наличие катетеров, дренажей, искусственной вентиляции легких и т.д. Основным биологическим материалом были мокрота, смывы с бронхов, моча, кровь, ликвор. Этиологически значимым признавался материал из стерильных локусов, но т.к. основную группу представляли культуры, выделенные из нестерильных локусов, экстраполяция результатов возможна только в связи с клинической картиной.

Обсуждение

Несмотря на то, что данные лабораторного исследования демонстрируют большую долю резистентных штаммов энтеробактерий, у пациентов не отмечалось случаев толерантности к терапии карбапенемами. Наибольшую проблему для подбо-

ра антибактериальных препаратов представляют инфекции, вызванные панрезистентными штаммами *Acinetobacter* spp. Учитывая положительный клинический эффект от АМП с минимальной антисинегнойной активностью, можно расценить выделение синегнойной палочки как колонизацию или контаминацию.

Принимая во внимание исключительную приспособляемость микроорганизмов и формирование резистентности, необходимо данную работу проводить на постоянной основе. Полученные результаты являются базой данных для определения тактики и стратегии применения антимикробных средств и эпидемиологического надзора в стационаре.

ЛИТЕРАТУРА

1. МУК 4.2.1890-04 определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.
2. Клинические рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Проект. Версия 2014-01.
3. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. Методические рекомендации. — М., 2014.
4. Руководство по применению наборов реагентов для обнаружения специфических участков ДНК возбудителей инфекций методом ПЦР с флуоресцентной детекцией результата в режиме реального времени (RealTime). Формат ФЛУОРОПОЛ-РВ. ООО НПФ «Литех», 2014.