

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616.24-002-078:577.21.08

А. Р. Мавзютов, И. А. Мирсяяпова, Г. Ф. Хасанова, А. Х. Баймиев

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИНФОРМАТИВНОСТИ МЕТОДОВ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии ГБОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России, Уфа

*Подобраны и апробированы олигонуклеотидные праймеры к гену 16S рРНК ряда возбудителей (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) внебольничной пневмонии для их высокоспецифичной детекции в клиническом материале при использовании полимеразной цепной реакции. В сравнении с бактериологическим методом (золотой стандарт) показаны высокая чувствительность, специфичность и диагностическая эффективность разработки, позволяющие использовать ее на практике для диагностики внебольничной пневмонии вне зависимости от длительности, тяжести течения и фазы заболевания и для создания соответствующих диагностических систем.*

Ключевые слова: внебольничная пневмония, бактериологическое исследование, полимеразная цепная реакция

A.R. Mavzyutov, I.A. Mirsayapova, G.F. Khasanova, A.Kh. Baymiyev

THE COMPARATIVE EVALUATION OF INFORMATIVITY OF METHODS OF ETIOLOGIC DIAGNOSTICS OF COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA

THE BASHKIR STATE MEDICAL UNIVERSITY OF MINZDRAV OF RUSSIA, UFA

*The article deals with the results of selection and testing of oligonucleotide primers to gene 16S rRNA of a number of agents of community-acquired pneumonia (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) for their highly specified detection in clinical material on application of polymerase chain reaction. The comparison with bacteriological method (golden standard) is used to demonstrate the high sensibility, specificity and diagnostic effectiveness of product enabling to apply it in practice to diagnose community-acquired pneumonia regardless of duration, severity and phase of disease and to develop corresponding diagnostic systems.*

Key words: community-acquired pneumonia, bacteriological analysis, polymerase chain reaction

Актуальность. К основным формам пневмоний относят внебольничную пневмонию (ВП), которую отличают распространенность среди населения всех возрастных групп, высокая смертность, особенно среди лиц пожилого возраста и новорожденных, и преимущественно бактериальная этиология [2, 7, 8].

Типичными для этого заболевания возбудителями являются *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*, выявляемые в 30–50 и 10% случаев заболевания соответственно. Несколько реже (3–5%) при ВП обнаруживают *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* [2–4, 6]. Однако не исключено, что истинная частота встречаемости и видовой состав возбудителей ВП могут существенно отличаться от данных литературы, поскольку для лабораторного их выявления и идентификации используются методы, информативность которых в зависимости от вида бактерий, исследуемого материала, фазы заболевания и т.д. может варьировать в очень широких пределах.

В частности, бактериологический метод (золотой стандарт диагностики ВП) не обеспечивает на практике выявления патогенов со сложными питательными потребностями, отличается низкой чувствительностью, продолжительностью и трудоемкостью исследования, чрезвычайно сложным преаналитическим этапом. Методы серодиагностики ВП имеют преимущественно анамнестическое значение и используются в основном для количественного определения специфических антител только к *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *L. pneumophila* [5, 6]. Еще уже спектр методов детекции антигенов (латекс-агглютинации и др.) ряда возбудителей ВП в биологических жидкостях (в моче и др.).

Большой диагностический интерес при ВП могут представлять молекулярно-генетические методы, главным образом различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР). В настоящее время их более широкое применение сдерживается узким спектром соответствующих тест-систем [4, 8–11]. В связи с этим целью исследования явились конструирование, испытание и сравнительная оценка информативности новых диагностических систем для ПЦР-детекции минорных возбудителей ВП в клиническом материале.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили 196 образцов мокроты от больных (в возрасте 18–80 лет), находившихся на стационарном лечении с установленным диагнозом ВП разной степени тяжести (29 больных с клиническим диагнозом ВП легкой степени тяжести, 137 – ВП средней степени тяжести, 30 – ВП с тяжелым течением). Группу сравнения составили 25 курящих (стаж курения не

Для корреспонденции:

Мавзютов Айрат Радикович, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой
Адрес: 450000, Уфа, ул. Ленина, 3
Телефон: 8-917-343-19-30
E-mail: ufalab@mail.ru

Таблица 1

Сравнительная оценка информативности БМ и ПЦР при лабораторной диагностике ВП, вызванных *S. pneumoniae*

Метод	4-полная таблица			ЧС, %	СП, %	ДЭ, %	ПЦ "+", %	ПЦ "-", %	PP, %	χ^2	<i>p</i>
	результат	больные	группа сравнения								
БМ	+	54 (ИП)	4 (ЛП)	76**	84*	78**	93	55***	48***	25	0,0001
	-	17 (ЛО)	21 (ИО)								
ПЦР	+	67 (ИП)	1 (ЛП)	94**	96*	95**	98	86***	84***	68	0,0001
	-	4 (ЛО)	24 (ИО)								

Примечание. Здесь и в табл. 2–6: статистически значимые различия: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

Таблица 2

Сравнительная оценка информативности БМ и ПЦР при лабораторной диагностике ВП, вызванных *S. influenzae*

Метод	4-полная таблица			ЧС, %	СП, %	ДЭ, %	ПЦ "+", %	ПЦ "-", %	PP, %	χ^2	<i>p</i>
	результат	больные	группа сравнения								
БП	+	37 (ИП)	5 (ЛП)	74*	80	76*	88	61**	49**	17,5	0,0001
	-	13 (ЛО)	20 (ИО)								
ПЦР	+	46 (ИП)	2 (ЛП)	92*	92	92*	96	85**	81**	43,6	0,0001
	-	4 (ЛО)	23 (ИО)								

более 7 лет), поскольку у практически здоровых лиц не было возможности получить мокроту для исследования. Для прямой детекции и идентификации возбудителей ВП в материале использовали бактериологический метод (БМ) и ПЦР с использованием собственных пар праймеров. Для проведения сравнительного анализа информативности методов детекции возбудителей ВП рассчитывали диагностическую эффективность по формулам А. Банержи [1]. Для определения статистической достоверности отличия от равномерного распределения по данным таблицы рассчитывали критерий χ^2 с поправкой Йетса и его уровень значимости [3].

Результаты и обсуждение. По результатам бактериологического исследования мокроты установлено, что у обследованных этиологически ВП преимущественно обуславливалась смешанной бактериальной микрофлорой – у 58 (29,6%) больных. У 28 (14,3%) больных в мокроте обнаружена *S. pneumoniae*, у 19 (9,7%) – *H. influenzae*, у 11 (5,6%) – *K. pneumoniae*, у 9 (4,6%) – *M. catarrhalis* и зафиксировано по 5 (2,6%) случаев выявления в мокроте *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Вместе с тем у 61 (31%) больного после проведения бактериологического исследования возбудитель установлен не был.

Для конструирования новых диагностических систем осуществлен поиск и сравнительный анализ (программа MegAlign, США) последовательностей ДНК ряда возбудителей ВП (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus*), представленных в международном банке нуклеотидных последовательностей EMBL/GenBank/DBJ, с целью обнаружения наиболее консервативных (специфичность) и одновременно мультикопийных (чувствительность) участков. В результате выбран ряд генов рибосомальных РНК и межгенного транскрибируемого спейсера, поскольку они всегда локализованы на хромосоме, медленно эволюционируют, а их продукты жизненно важны и функционально консервативны. Указанное позволяет рассматривать эти мишени в качестве наиболее приемлемых при установлении филогенетического положения микроорганизмов и соответственно для подбора видоспецифических праймеров. В дальнейшем при использовании программы PrimerSelect из пакета компьютерных программ Lasergene (DNASTAR, Inc., США) были подобраны и протестированы пары олигонуклеотидных праймеров для детекции ряда наиболее частых возбудителей ВП – *S. pneumoniae* (Strepp), *H. influenzae* (Hem), *M. catarrhalis* (Mara), *K. pneumoniae* (Kleb), *P. aeruginosa* (*P. aerugin*), *S. aureus* (*S. aureus16*) – к генам 16S рРНК.

При использовании ПЦР в мокроте обследованных при ВП в 56 (28,6%) случаях выявлена смешанная бактериальная микрофлора. При этом заболевание клинически протекало в более тяжелой форме. У 39 (19,9%) больных ВП методом ПЦР с подобранными праймерами выявлены *S. pneumoniae*, у 28 (14,3%) – *H. influenzae*, у 11 (5,6%) – *M. catarrhalis*, у 13 (6,6%) – *K. pneumoniae*, у 11 (5,6%) – *P. aeruginosa*; *S. aureus* выявлены у 5 (2,6%) больных. У 29 (14,8%) больных результаты ПЦР с использованием всех сконструированных праймеров были отрицательны – этиологию ВП расшифровать не удалось.

Проведено сравнение достоверности различий частот обнаружения указанных возбудителей ВП в мокроте культуральным и молекулярно-генетическим методом с использованием подобранных праймеров. Установлено, что при использовании метода ПЦР частота обнаружения возбудителя статистически значимо выше в сравнении с таковой при использовании культурального метода при ВП, вызванных *S. pneumoniae* ($\chi^2 = 118,04$, $p = 0,0004$), *H. influenzae* ($\chi^2 = 101,07$, $p = 0,00001$), *M. catarrhalis* ($\chi^2 = 39,18$, $p = 0,00001$), *K. pneumoniae* ($\chi^2 = 113,82$, $p = 0,0002$) и *P. aeruginosa* ($\chi^2 = 88,4$, $p = 0,0005$). При диагностике ВП, обусловленных *S. aureus*, результаты ПЦР и бактериологического исследования идентичны – 2,6% (у 5 больных).

В ходе сравнительного анализа показателей информативности ПЦР и БМ в диагностике ВП показано, что ПЦР характеризовалась наибольшей диагностической эффективностью ($p = 0,0036$) при диагностике ВП, вызванных *S. pneumoniae*, и обеспечивала статистически значимо более высокую чувствительность ($p = 0,0032$) и специфичность ($p = 0,018$) по сравнению с результатами культурального исследования. Низкий показатель «разности рисков» бактериологического исследования свидетельствовал о низкой прогностической значимости его результата по сравнению с данными ПЦР ($p = 0,0001$; табл. 1).

Сравнение информативности БМ и ПЦР при диагностике ВП, обусловленных *H. influenzae* и *K. pneumoniae*, также свидетельствовало о статистически значимо большей диагностической эффективности ПЦР ($p = 0,046$ и $p = 0,03$ соответственно), тогда как культуральный метод также отличался низкой прогностической значимостью полученного результата (табл. 2 и 3).

При ВП, обусловленных *M. catarrhalis*, информативность ПЦР статистически значимо выше информативности бак-

Таблица 3

Сравнительная оценка информативности БМ и ПЦР при лабораторной диагностике ВП, вызванных *K. pneumoniae*

Метод	4-полная таблица			ЧС, %	СП, %	ДЭ, %	ПЦ "+", %	ПЦ "-", %	РР, %	χ^2	<i>p</i>
	результат	больные	группа сравнения								
БМ	+	27 (ИП)	4 (ЛП)	77*	84	80*	87	72*	59*	62	0,003
	-	8 (ЛО)	21 (ИО)								
ПЦР	+	32 (ИП)	2 (ЛП)	91*	92	92*	94	88*	83*	71	0,001
	-	3 (ЛО)	23 (ИО)								

Таблица 4

Сравнительная оценка информативности БМ и ПЦР при лабораторной диагностике ВП, вызванных *M. catarrhalis*

Метод	4-полная таблица			ЧС, %	СП, %	ДЭ, %	ПЦ "+", %	ПЦ "-", %	РР, %	χ^2	<i>p</i>
	результат	больные	группа сравнения								
БМ	+	18 (ИП)	2 (ЛИ)	50***	92	67**	90	56**	46***	9,9	0,0016
	-	18 (ЛО)	23 (ИО)								
ПЦР	+	33 (ИП)	1 (ЛИ)	92***	96	93**	97	89**	86***	42	0,00001
	-	3 (ЛО)	24 (ИО)								

Таблица 5

Сравнительная оценка информативности БМ и ПЦР при лабораторной диагностике ВП, вызванных *S. aureus*

Метод	4-полная таблица			ЧС, %	СП, %	ДЭ, %	ПЦ "+", %	ПЦ "-", %	РР, %	χ^2	<i>p</i>
	результат	больные	группа сравнения								
БМ	+	14 (ИП)	3 (ЛП)	74*	88*	82*	82*	83*	65**	20	0,0001
	-	5 (ЛО)	22 (ИО)								
ПЦР	+	19 (ИП)	0 (ЛП)	100*	100*	100*	100*	100*	100**	40	0,00001
	-	0 (ЛО)	25 (ИО)								

Таблица 6

Сравнительная оценка информативности БМ и ПЦР при лабораторной диагностике ВП, вызванных *P. aeruginosa*

Метод	4-полная таблица			ЧС, %	СП, %	ДЭ, %	ПЦ "+", %	ПЦ "-", %	РР, %	χ^2	<i>p</i>
	результат	больные	группа сравнения								
БМ	+	11 (ИП)	0 (ЛП)	55**	100	80	100	73*	73*	15,3	0,0001
	-	9 (ЛО)	25 (ИО)								
ПЦР	+	19 (ИП)	0 (ЛП)	95**	100	98	100	96*	96*	37,3	0,00001
	-	1 (ЛО)	25 (ИО)								

териологического исследования по чувствительности ($p = 0,0002$), диагностической эффективности ($p = 0,0074$), «разности рисков» ($p = 0,0006$), прогностической ценности отрицательного результата ($p = 0,0025$), тогда как различия между указанными методами по показателям специфичности ($p = 0,47$), прогностической ценности положительного результата ($p = 0,23$) статистически незначимы (табл. 4).

При лабораторной диагностике ВП, ассоциированных с *S. aureus*, чувствительность ($p = 0,03$), специфичность ($p = 0,05$) и «разность рисков» ($p = 0,00001$) составила 100%. Эти показатели статистически значимо выше, чем при применении БМ, и превышают соответствующие значения для ранее рассмотренных видов (за счет отсутствия ложноположительных результатов; табл. 5).

При сравнительной оценке информативности обнаружения *P. aeruginosa* в мокроте культуральным методом и ПЦР прогностическая ценность положительного результата одинакова для каждого из этих методов – 100% (ложноположительные результаты отсутствуют). Однако показатель «раз-

ности рисков» ($p = 0,05$) статистически значимо выше при ПЦР по сравнению с бактериальным методом вследствие меньшей чувствительности последнего ($p = 0,005$; табл. 6).

Заключение. Вне зависимости от длительности и тяжести течения ВП диагностическая информативность ПЦР статистически достоверно выше диагностической ценности культурального исследования по основным критериям эффективности лабораторного исследования. В частности, высокие значения показателей «разности рисков» ПЦР свидетельствуют о высокой прогностической значимости результатов, получаемых при использовании именно данного метода. Сказанное, на наш взгляд, объективно обосновывает необходимость более широкого применения ПЦР для этиологической диагностики ВП, а в ряде случаев позволяет рекомендовать ПЦР в качестве золотого стандарта.

Работа выполнена в соответствии с ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. ГК № П385 от 30.07.2009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Банержи А. Медицинская статистика понятным языком: вводный курс. – М.: Практическая медицина, 2007.
2. Зубков М. Н. // Пульмонология. – 2005. – № 5. – С. 53–60.
3. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: Медиа Сфера, 2002.
4. Савинова Т. Л. и др. // Клинический микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2009. – Т. 11, № 1. – С. 79–80.
5. Херрингтон С., Макги Д. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ. – М.: Мир, 1999.
6. Чучалин А. Г. и др. // Клинический микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 186–226.
7. Чучалин А. Г. Внебольничная пневмония у детей: Распространенность, диагностика, лечение и профилактика. – М.: Медицина, 2011.
8. Harris M. et al. // Thorax. – 2011. – Vol. 66 (suppl. 2). – P. 584.
9. Ortqvist A. // Eur. Respir. J. – 2002. – Vol. 20 (suppl. 36). – P. 40–53.
10. Stralin K., Korgaard J. // Eur. Respir. J. – 2006. – Vol. 28. – P. 568–575.
11. Utine G. E., Pinar A. // Respiration. – 2008. – Vol. 75. – P. 437–442.

Поступила 13.02.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616.24-002-022.369-078

С. М. Омарова¹, З. М.-К. Муталипова², З. М. Нурмагомедова¹, Д. Ш. Меджидова², Р. Ю. Юнусова¹, В. Г. Горелова²**ВИДОВОЙ СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ В СТАЦИОНАРАХ ХИРУРГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ МАХАЧКАЛЫ**¹Лаборатория листериоза Филиал ФГУП НПО «Питательные среды» НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России, ²ГОУ ВПО Дагестанская медицинская академия, Махачкала

Наиболее распространенной формой проявления внутрибольничной инфекции (ВБИ) является нозокомиальная пневмония, которая остается ведущей причиной смерти среди всех ВБИ. В отделениях реанимации и интенсивной терапии пневмония составляет более 25% всех ВБИ.

Исследование смывов с различных узлов аппаратов искусственной вентиляции легких в отделениях реанимации и интенсивной терапии хирургических стационаров показало, что чаще (72%) высевалась грамотрицательная микрофлора, которая в последние годы играет ведущую роль в развитии тяжелых форм нозокомиальной пневмонии. На долю грамотрицательных неферментирующих бактерий приходилось 38,8% выделенных культур. Аналогичная микрофлора выделялась и из трахеобронхиальных смывов, что подтверждает возможность распространения инфекции через наркозно-дыхательную аппаратуру.

Ключевые слова: нозокомиальная пневмония, искусственная вентиляция легких, вентилятор-ассоциированная пневмония, грамотрицательная микрофлора

S.M. Omarova, Z.M.-K. Mutalypova, Z.M. Nurmagomedova, D.Sh. Medjydova, R.Yu. Yunusova, V.G. Gorelova

THE SPECIFIC COMPOUND AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF AGENTS OF NOSOCOMIAL PNEUMONIA ISOLATED IN HOSPITAL SURGERY DEPARTMENTS OF MAKHACHKALA

The nosocomial pneumonia is the most prevailing form of hospital-acquired infection. It is the leading cause of mortality among all forms of hospital-acquired infections. In the departments of resuscitation and intensive therapy nosocomial pneumonia consists more than 25% of all hospital-acquired infections. The analysis of lavages of various components of apparatuses of artificial pulmonary ventilation in the departments of resuscitation and intensive therapy of surgery hospital departments demonstrated that gram-negative micro-flora inoculated more often (72.0%). During last years, this type of micro-flora plays leading part in development of severe forms of nosocomial pneumonia. The gram-negative bacteria consisted up to 38/8% of all isolated cultures. The similar micro-flora was isolated and from tracheobronchial lavages and it confirms the possibility of infection spreading by anesthetic breathing equipment.

Key words: nosocomial pneumonia, artificial pulmonary ventilation, ventilator-associated pneumonia, gram-negative micro-flora

Актуальной проблемой лечебных учреждений многих экономически развитых и развивающихся стран мира остаются внутрибольничные (нозокомиальные) инфекции (ВБИ) [1–3, 6–9]. Так, в европейских странах их переносят 3–10% пациентов, в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) частота ВБИ составляет 20% [3, 12]. По данным ВОЗ, показатель летальности у больных на фоне развившихся ВБИ повышается в 10 раз [1, 3].

Наиболее распространенной клинической формой проявления ВБИ после инфекций мочевых путей является нозокомиальная пневмония (НП) – основная причина смерти среди всех ВБИ [2, 3]. На 1000 больных, находящихся на стационарном лечении, в среднем приходится 5–10 случаев НП [11]. В ОРИТ пневмония составляет более 25% всех инфекций. Для больных, находящихся на искусственной вентиляции легких (ИВЛ), риск развития вентилятор-ассоциированной пневмонии (ВАП) возрастает в 20 раз [12, 14, 15].

В структуре возбудителей ВБИ преобладают условно-патогенные бактерии (УПБ), циркулирующие в госпитальной среде, характерными особенностями которых являются множественная лекарственная устойчивость и устойчивость по отношению к неблагоприятным факторам внешней среды [3, 9, 13].

НП может быть обусловлена широким спектром возбудителей, из которых наиболее часто встречаются грамо-

Для корреспонденции:

Омарова Салидат Магомедовна, д-р биол. наук, зав. лаб.

Адрес: 367025, Махачкала, ул. Леваневского, 24

Телефон: 8(8722)67-05-75

E-mail: omarovanpo@mail.ru