

В.Н. Ильина, А.И. Субботовская, Л.Г. Князькова, В.С. Козырева,
Т.С. Скачкова*, О.Ю. Шипулина*, Д.С. Сергеевичев, А.П. Субботовский

Применение молекулярно-биологических методов исследования для диагностики инфекции области хирургического вмешательства, вызванной бактериями рода *Staphylococcus*

ФГБУ «ННИИП
им. акад. Е.Н. Мешалкина»
Минздравсоцразвития
России, 630055,
Новосибирск,
ул. Речкуновская, 15,
crpsc@nncsr.ru

* ФГУН «Центральный НИИ
эпидемиологии» Роспотреб-
надзора, 111123, Москва,
ул. Новогиреевская, 3 а

УДК 616-002-078:616.12-089-06
БАК 14.01.20

Поступила в редакцию
7 сентября 2011 г.

© В.Н. Ильина,
А.И. Субботовская,
Л.Г. Князькова, В.С. Козырева,
Т.С. Скачкова, О.Ю. Шипулина,
Д.С. Сергеевичев,
А.П. Субботовский, 2011

В настоящее время наряду с традиционными микробиологическими и иммунологическими методами лабораторной диагностики инфекционных заболеваний используются методы, основанные на молекулярно-биологических технологиях. Они позволяют проводить прямое изучение этиологии и антибиотикорезистентности возбудителя без его предварительного культивирования. В работе представлены сравнительные данные, полученные в ходе ПЦР-анализа и микробиологического исследования инфекций области хирургического вмешательства (ИОХВ), вызванные стафилококками. Целью данной работы явилось изучение возможности использования ПЦР для прямой диагностики инфекций области хирургического вмешательства (ИОХВ) стафилококковой этиологии. В ходе проведенной работы получена высокая чувствительность (98,6%) и специфичность (95,8%) ПЦР-анализа. Показано, что ПЦР-анализ значительно ускоряет получение результатов, по сравнению с традиционным микробиологическим исследованием в случае возникновения ИОХВ, вызванной MR стафилококками. Ключевые слова: стафилококки; полимеразная цепная реакция; резистентность к метициллину; инфекции области хирургического вмешательства.

По данным Национальной системы наблюдения за нозокомиальными инфекциями (National Nosocomial Infections Surveillance, NNIS), инфекции области хирургического вмешательства (ИОХВ) являются второй-третьей по частоте нозокомиальной инфекцией, в зависимости от профиля стационара. Согласно результатам проспективного мультицентрового исследования, частота ИОХВ после проведения кардиохирургических операций составляет 3,0% (38 гнойных осложнений на 1 268 операций). Однако, по данным отдельных авторов, инфекции области операции у кардиохирургических больных регистрируются в 10,4% случаев. Наиболее часто ИОХВ возникают после операции коронарного шунтирования, реже после операций по поводу ВПС и ППС. По данным многочисленных исследований, преобладающими возбудителями ИОХВ в кардиохирургии являются бактерии рода *Staphylococcus*, которые выделяются в 70–80% случаев [8, 10, 12–14, 17]. По результатам Национальной системы наблюдения за нозокомиальными инфекциями (NNIS) частота выделения *S. aureus* и коагулазонегативных стафилококков (CoNS) при ИОХВ

после кардиохирургических вмешательств составляет 32,5 и 21,9% соответственно.

Современные методы молекулярной диагностики (ПЦР) позволяют проведение прямого ПЦР-анализа этиологии и антибиотикорезистентности возбудителя без предварительного культивирования последнего. Основным преимуществом ПЦР-анализа является высокая производительность и скорость получения результатов по сравнению с культуральными методами [3, 6, 7]. Нами проведено исследование по обнаружению ДНК *S. aureus* и участка геномного материала, несущего ген *mec A* в клинических образцах. Целью данного исследования стало изучение возможности использования ПЦР-анализа для прямого установления инфекции области хирургического вмешательства, вызванной бактериями рода *Staphylococcus*, и выявления резистентности к метициллину, обусловленной геном *mec A*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Всего изучено 143 образца, доставленных в микробиологическую лабораторию

за период с февраля по июнь 2011 года. Забор материала производился сухим стерильным ватным тампоном с учетом клинической целесообразности в области стернотомной раны. В анализ были включены все поступившие для микробиологического исследования клинические образцы. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) применяли для исследования как исходного образца, так и чистой культуры выделенных стафилококков. Для ПЦР-анализа тампон с образцом или чистой культурой погружался в 0,5 мл транспортной среды «ТСМ» (ИнтерЛабСервис, Россия). Выделение ДНК осуществляли набором реагентов «Рибо-Преп» (ИнтерЛабСервис, Россия) согласно прилагаемой инструкции. Постановку реакции амплификации осуществляли с использованием коммерческой тест-системы «АмплиСенс MRSA-скрин-титр-FL» (ИнтерЛабСервис, Россия) на флюоресцентном детектирующем термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США) в режиме реального времени.

Посев материала производили общепринятыми в микробиологической практике методами. Идентификацию проводили на анализаторах ATB-expression (bioMérieux, Франция) и Phoenix (Becton Dickinson, США). Для определения чувствительности использовали чистые культуры выделенных возбудителей. Метициллинорезистентность исследовали с помощью дисков, пропитанных оксациллином и цефокситином (Bio-Rad, США) на агаре Мюллер-Хинтон (bioMérieux, Франция) в соответствии с рекомендациями Национального комитета по клиническим и лабораторным стандартам США (CLSI, 2004) и Методическими указаниями по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (МУК 4.2 1890-04. 2004) и на анализаторе ATB-expression (bioMérieux, Франция) и Phoenix (Becton Dickinson, США). Сравнение результатов микробиологического исследования и ПЦР-анализа проводили после окончательного результата посева.

Сравнительный анализ чувствительности и специфичности ПЦР-анализа по сравнению с классическими бактериологическими методами осуществляли с использованием программного обеспечения Ridom EpiCompare (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из 143 исследованных образцов в 87 (60,8%) пробах получен рост бактерий рода *Staphylococcus*. При этом в 72 (50,3%) случаях стафилококки были идентифицированы как *S. epidermidis*, в 8 (5,6%) – *S. aureus*, в 5 (3,5%) – *S. saprophyticus* и по 1 (0,7%) *S. sciuri* и *S. haemolyticus*. В 37 (27,6%) рост отсутствовал и в 17 (11,7%) выявлен рост бактерий, не относящихся к роду стафилококков (рис. 1).

Фенотипически метициллинорезистентность выявлена у 69 штаммов стафилококков, что составило 48,2% от числа изученных клинических образцов. Устойчивость к метициллину выявлена в 1,4% (2 штамма) у *S. aureus* и в 46,8% у CoNS (67 штаммов) (табл. 1).

Метициллинорезистентные коагулазонегативные стафилококки были представлены следующими видами: *S. epidermidis* (42,6%), *S. saprophyticus* (2,8%), *S. sciuri* (0,7%) и *S. haemolyticus* (0,7%).

Все чистые штаммы MRS тестировались на наличие гена *mec A* методом ПЦР-анализа, во всех случаях был выявлен участок гена *mec A*. В ходе ПЦР-анализа ДНК *S. aureus* обнаружена в 8 (5,6%), ген *mec A S. aureus* в 2 и ген *mec A CoNS* – 73 клинических образцах (табл. 2).

При сравнении результатов ПЦР-анализа и данных микробиологического исследования получены следующие результаты: в 6 пробах, в которых обнаружены только ДНК *S. aureus*, получен рост MSSA, в 2 пробах, в

Таблица 1

Результаты микробиологического исследования клинического материала (n = 143)

Результаты исследования	Кол-во образцов, абс		
	Получен рост	Рост отсутствовал	% роста
<i>S. aureus</i>	8	135	5,6
MRSA	2	141	1,4
MR CoNS	67	76	46,8

Таблица 2

Результаты исследования клинического материала молекулярно-биологическим методом (n = 143)

Результаты исследования	Кол-во образцов, абс		
	Обнаружен	Не обнаружен	% обнаружения
ДНК <i>S. aureus</i>	8	135	5,6
Ген <i>mec A S. aureus</i>	2	141	1,4
Ген <i>mec A CoNS</i>	73	70	51,0

Таблица 3

Сравнение результатов исследования клинического материала молекулярно-биологическим и микробиологическим методами (n = 143)

Общее кол-во образцов n (абс.)	Данные ПЦР-анализа, n (абс.)		Данные микробиологического исследования, n (абс.)					Нет роста n (абс.)
	ДНК <i>S. aureus</i>	Ген <i>mec A</i>	MSSA	MRSA	MR CoNS	MS CoNS	Не стафилококки	
8	8	2	6	2	–	–	–	–
73	–	73	–	–	66	–	3	3
62	–	–	–	–	1	12	13	37

которых выделены ДНК *S. aureus* и ген *mec A*, рост MRSA (табл. 3). В 73 образцах, в которых обнаружены только ДНК участка несущего ген *mec A*: в 66 – получен рост метициллинорезистентных коагулазонегативных стафилококков (MR CoNS), в 3 – рост бактерий, не относящихся к роду *Staphylococcus*, и в 3 – рост отсутствовал.

Из 62 клинических образцов, в которых ДНК *S. aureus* и ген *mec A* не обнаружены, в 12 получен рост метициллиночувствительных коагулазонегативных стафилококков (MS CoNS), в 1 – рост метициллинорезистентного *S. epidermidis*, в 13 – рост бактерий, не относящихся к роду *Staphylococcus*, и в 37 – рост отсутствовал.

Таким образом, совпадение результатов ПЦР-анализа и микробиологического исследования составило 100% при обнаружении в клинических образцах ДНК *S. aureus* и гена *mec A*. В то время как при обнаружении только гена *mec A* совпадение отмечено в 95,5% случаев.

В целом, при сравнении результатов ПЦР-анализа и результатов, полученных в ходе микробиологического исследования, совпадение наблюдалось в 137 (95,8%) случаях. При этом чувствительность ПЦР-анализа составила 98,6% и специфичность – 95,8%. Конкордантность теста 0,958.

ОБСУЖДЕНИЕ

Современные методы ПЦР позволяют выявить в клиническом материале как конкретного возбудителя, так и его генетически обусловленную антибиотикорезистентность. Иными словами, ПЦР дает ответ «узкой направленности», в то время как культуральные методы позволяют выявить рост различных видов микроорганизмов и определение чувствительности одновременно к препаратам, относящимся к разным группам. При этом время проведения ПЦР-анализа составляет 3–4 ч, а микробиологическое исследование в среднем длится от 3 до 5 дней.

К основным возбудителям инфекций, возникших после проведения кардиохирургических операций по данным [15] относятся коагулазонегативные стафилококки (CoNS) и *S. aureus*, частота которых составляет 36/91 (39,6%) и 15/91 (16,5%) соответственно. CoNS были выделены в 42–64% случаев при исследовании поверхнос-

тных и глубоких инфекций в области стернотомной раны [16]. Наиболее тяжелым осложнением после кардиохирургических вмешательств является медиастинит. Большинство послеоперационных медиастинитов в кардиохирургии вызывается *Staphylococcus aureus*, на долю которых приходится не менее 50% случаев этого осложнения. Коагулазонегативные стафилококки чаще выделяются при нестабильности грудины [7, 9, 11].

Терапия ИОХВ включает хирургическое дренирование и использование антибиотиков и антисептиков. К основным антибиотикам, используемым для терапии стафилококковых инфекций, относятся бета-лактамы (прежде всего оксациллин, цефазолин и амоксициллин/клавулат), гликопептиды (ванкомицин) и оксазолидиноны (линезолид) [7]. Ключевым моментом в выборе антибиотика служит выявление MRS. Резистентность стафилококков к метициллину может быть обусловлена тремя механизмами: продукцией дополнительного пенициллинсвязывающего белка (ПСБ) – ПСБ-2а, кодируемого геном *mec A*; инактивацией вследствие гиперпродукции бета-лактамаз; модификацией нормальных ПСБ. При этом клиническое значение имеет *mec A*-обусловленная резистентность. Это связано с тем, что при инфекциях, вызванных штаммами стафилококков с *mec A*, терапия бета-лактамами антибиотиками неэффективна. Препаратом выбора при инфекциях, вызванных MRS штаммами, является ванкомицин [1, 5–7]. Таким образом, обнаружение *mec A*-обусловленной резистентности к метициллину необходимо для решения вопроса при выборе средства лечения. По результатам исследований отдельных авторов, выделение метициллинорезистентного *Staphylococcus aureus* при развитии послеоперационного медиастинита является фактором риска неблагоприятного исхода [1, 6, 7, 12].

Таким образом, при развитии ИОХВ предположительно стафилококковой этиологии с клинической точки зрения необходимо получить ответ о виде стафилококка (*S. aureus* или CoNS) и о наличии у выделенных стафилококков гена *mec A*.

Используемый нами набор реагентов позволяет выявить наличие ДНК золотистого стафилококка и участка геномного материала, несущего ген *mec A*, как у *S. aureus*, так и у коагулазонегативных стафилококков. При использовании набора в нашем исследовании регистрирова-

лось совпадение результатов ПЦР-анализа и результатов микробиологического исследования в 95,8% случаев. В случае выделения MRSA и MSSA совпадение отмечено в 100%. Чувствительность ПЦР-анализа составила 98,6%, специфичность – 95,8%. Конкордантность – 0,958.

Результат ПЦР-анализа был получен через 3 ч от момента поступления клинического образца в ПЦР лабораторию. На практике окончательный результат ПЦР-анализа обычно получают к концу рабочего дня, в связи с чем в клиническое отделение, направившее образец, результат поступит на следующий день, что позволит сравнить его с результатами посева и принять решение о соответствующей антимикробной терапии менее чем через сутки от момента доставки клинического образца в лабораторию.

При отсутствии ДНК *S. aureus* и участка, несущего ген *tes A*, возможными возбудителями могут быть как метициллинчувствительные CoNS, так и бактерии, не относящихся к роду *Staphylococcus*. Выделение возбудителя по-прежнему считается «золотым» стандартом диагностики инфекционных заболеваний, в связи с чем данные ПЦР-анализа следует сопоставлять с результатами, полученными в ходе микробиологического исследования.

ПЦР-анализ клинического образца, полученного у пациентов с инфекцией в области хирургической раны после кардиохирургического вмешательства, значительно ускоряет результат исследования (в сравнении с микробиологическим) в случае инфекции, обусловленной как MRSA, так и MR CoNS. ПЦР-исследование может быть использовано для контроля эффективности проводимой антимикробной терапии ИОХВ с ранее установленной MRSA и MR CoNS этиологией. Чувствительность ПЦР-анализа составила 98,6%, специфичность – 95,8%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дехнич А.В. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 1999. Т. 1. №1. С. 89–91.
- Зузова А.П., Белькова Ю.А. // Фарматека 2007. Т. 139. № 4. С. 67–74.
- Лопухов Л.В., Эйдельштейн М.В. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2000. Т. 2. № 3. С. 96–106.
- Манграм А.Дж., Хоран Т.С., Пирсон М.Л. и др. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2003. Т. 5. № 1. С. 74–101.
- Никулин А.А., Дехнич А.В. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2010. Т. 12. № 1. С. 4–22.
- Сидоренко С. В., Шляпников С. А. // Успехи биологической химии. 2004. Т. 44. С. 263–306.
- Шляпников С.А., Сидоренко С.В. // Инфекции в хирургии. 2010. Т. 8. № 3. С. 40–46.
- Dodds A., Carroll D., Engemann J. et al. // Clin. Infect. Dis. 2004. V. 38. P. 1555–1560.
- Eguia J., Chambers H. // Semin Respir. Crit. Care Med. 2003. V. 24. № 1. P. 37–34.
- Gardlund B., Bitkover C., Vaage J. // Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2002. V. 21. № 5. P. 825–830.
- Lin C., Hsu R., Chang S. // Clin. Infect. Dis. 2003. V. 37. P. 679–684.
- Ridderstolpe L., Gill H., Granfeldt H. // Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2001. V. 20. № 6. P. 1168–1175.
- Tegnell A., Aren C., Ohman L. // Ann. Thorac. Surg. 2000. V. 69. P. 1104–1109.
- Upton A., Roberts S.A., Milsom P., Morris A.J. // J. Surg. 2005. V. 75. P. 198–203.

Ильина Вера Николаевна – кандидат медицинских наук, врач бактериологической лаборатории ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск).

Субботовская Анна Игоревна – младший научный сотрудник группы клинической иммунологии лаборатории клинко-биохимических исследований ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск).

Князькова Любовь Георгиевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинко-биохимических исследований ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск).

Козырева Виктория Сергеевна – врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клинической иммунологии отделения лабораторной диагностики ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск).

Скачкова Татьяна Сергеевна – младший научный сотрудник отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва).

Шипулина Ольга Юрьевна – руководитель лаборатории молекулярных методов отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва).

Сергеевичев Давид Сергеевич – кандидат биологических наук, и.о. заведующего лабораторией экспериментальной хирургии и морфологии ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск).

Субботовский Антон Павлович – стажер-исследователь лаборатории анестезиологии и реаниматологии ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск).