

## Локальный опыт интеграции ПЦР в режиме реального времени в программы микробиологического мониторинга (на примере стационара онкологического профиля)

Зыкова Т.А., Кит О.И., Маслов А.А., Богомоллова О.А., Петров Д.С., Дурицкий М.Н.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия

Контактный адрес:  
Татьяна Алексеевна Зыкова  
Эл. почта: tatiana2904@yandex.ru

Ключевые слова: молекулярные методы, ПЦР в режиме реального времени, микробиологический мониторинг, колонизация.

**Цель.** Изучить уровень и структуру микробной колонизации у онкологических больных до поступления на хирургическое лечение с использованием молекулярных методов.

**Материалы и методы.** Методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени был исследован клинический материал на наличие ДНК метициллинорезистентного *Staphylococcus aureus*, метициллинорезистентных коагулазонегативных стафилококков, *Candida albicans*/*C. glabrata*/*C. krusei*, *Acinetobacter baumannii* и культуры микроорганизмов на наличие генетических детерминант антибиотикорезистентности.

**Результаты.** Установлен высокий уровень колонизации онкологических больных микроорганизмами, имеющими гены, кодирующие продукцию бета-лактамаз. Уже при поступлении в стационар 56,6% онкологических больных были колонизированы метициллинорезистентными стафилококками, 20% – *A. baumannii*, 24,8% – *Candida* spp. Из числа колонизированных *A. baumannii*, 35,9% имели гены OXA-карбапенемаз. Наиболее распространенным возбудителем при возникновении инфекционных осложнений был *A. baumannii*, продуцирующий bla<sub>OXA40</sub>.

**Выводы.** Показано, что молекулярные методы могут эффективно использоваться не только для диагностики инфекционных заболеваний, но и в программах микробиологического мониторинга.

## Local experience of real-time PCR implementation into microbiological monitoring programs

Zykova T.A., Kit O.I., Maslov A.A., Bogomolova O.A., Petrov D.S., Duritskiy M.N.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Contacts:  
Tatiana A. Zykova  
E-mail: tatiana2904@yandex.ru

Key words: molecular methods, real-time PCR, microbiological monitoring, colonization.

**Objective.** To study level and structure of microbial colonization in cancer patients before admission to a surgery department using molecular methods.

**Materials and methods.** The presence of DNA of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci, *Candida albicans*/*C. glabrata*/*C. krusei*, *Acinetobacter baumannii* in the clinical specimens and the presence of antimicrobial resistance genes in cultures were detected by multiplex real-time PCR. A total of 741 clinical samples and 313 cultures were studied.

**Results.** The high level of microbial colonization, including microorganisms with antibiotic resistance genes, was found in cancer patients. Methicillin-resistant staphylococci, *A. baumannii* and *Candida* spp. were detected in 56.6%, 20% and 24.8% of cancer patients, respectively. Of patients infected with *A. baumannii*, 35.9% had OXA-carbapenemase genes. *A. baumannii* producing bla<sub>OXA40</sub> was the most common cause of infectious complications.

**Conclusions.** Molecular methods can be used effectively not only for the diagnosis of infectious diseases, but also in microbiological monitoring programs.

### Введение

Стратегической задачей здравоохранения является обеспечение качества медицинской помощи и создание безопасной среды пребывания для пациентов и персонала в организациях, осуществляющих медицинскую деятельность. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), являются важнейшей составляющей этой проблемы в силу широкого распространения, негативных последствий для здоровья пациентов,

персонала и экономики государства [1]. По мнению ряда авторов, эффективным элементом обеспечения безопасности в медицинских организациях является система управления рисками, позволяющая выявлять и оценивать риски, принимать на основании их анализа управленческие решения по ограничению или устранению случайных событий, создающих угрозу жизни и здоровью персонала и пациентов [2]. В управлении рисками

по общему правилу выделяют 5 основных этапов: выявление угроз и опасностей, оценка и определение, кто и что может быть повреждено и каким образом, оценка риска и принятие решений относительно мер предосторожности, документальное фиксирование и внедрение, пересмотр системы управления риском [3].

Задача выявления потенциальных угроз в отношении инфекционной патологии может быть решена с помощью организации адекватной системы локального микробиологического мониторинга. В современной научной литературе широко представлены данные о необходимости его проведения и формирования на основании полученных данных микробиологического паспорта стационара [4-6]. Интенсивное развитие высокотехнологичных, инвазивных методов диагностики и лечения в сочетании с широким распространением микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью определяет необходимость непрерывного совершенствования системы микробиологического мониторинга.

В то же время, 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 относятся 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) [7].

Необходимо учитывать, что на момент госпитализации онкологические больные зачастую уже имеют длительную историю посещения медицинских учреждений и, как правило, контаминированы широким спектром микроорганизмов. Учитывая вышесказанное и имея опыт применения количественной ПЦР-РВ для диагностики инфекционных осложнений у онкологических больных [8], нам представилось интересным изучить состояние микробной колонизации онкологических больных.

**Целью** исследования было определение уровня и структуры микробной колонизации пациентов, поступающих в онкологический стационар для хирургического лечения, и оценка перспективности включения метода ПЦР-РВ в скрининговые программы микробиологических исследований.

## Материалы и методы

Материалом для исследования служили мазки со слизистой оболочки ротоглотки и носа, ректальные мазки, отделяемое послеоперационных ран, культуры микроорганизмов. Экстракцию ДНК из клинического материала проводили с использованием наборов реагентов производства ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора в соответствии с инструкцией производителя и в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО).

Аmplификацию и детекцию ДНК осуществляли методом мультиплексной ПЦР-РВ с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации на термоциклере Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Германия). Для выполнения количественного анализа проводили одновременную амплификацию с детекцией для образцов ДНК, полученных из клинического материала и ДНК-калибраторов. Использовали наборы реагентов для выявления и количественного определения ДНК метициллинчувствительного (MSSA) и метициллинорезистентного (MRSA) *Staphylococcus aureus*, метициллинорезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. (MRCoNS), для выявления *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, для выявления генов металло-бета-лактамаз групп VIM, IMP, NDM и генов карбапенемаз групп KPC и OXA-48 у изолятов клинически значимых грамотрицательных бактерий, для определения OXA-карбапенемаз *Acinetobacter baumannii* (OXA-51, OXA-23, OXA-40, OXA-58), для выявления генов *vanA* и *vanB* *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*, для выявления генов EBSL типа CTX-M у представителей семейства Enterobacteriaceae. Всего было исследовано 741 образец клинического материала, 313 культур микроорганизмов, проведено 1347 исследований.

## Результаты и обсуждение

Метод ПЦР-РВ использовали в следующих программах микробиологического мониторинга:

- изучение уровня колонизации пациентов MRSA, продуцирующими карбапенемазы штаммами *A. baumannii* и грибами рода *Candida* при поступлении в стационар;
- определение уровня носительства MRSA среди медицинского персонала;
- выявление наиболее распространенных механизмов приобретенной антибиотикорезистентности у клинически значимых изолятов микроорганизмов.

Несмотря на тенденцию к снижению частоты выявления, MRSA является одним из наиболее часто встречающихся полирезистентных возбудителей в Европе, особенно в Южной и Юго-Восточной ее части [9]. Однако в России обязательное обследование всех поступающих пациентов на носительство MRSA не проводится. В то же время известно, что подобный скрининг является неотъемлемой частью программ снижения MRSA-инфекций.

При поступлении в хирургические отделения у 56,6% онкологических больных наблюдали колонизацию слизистой носа метициллинорезистентными стафилококками, в том числе колонизацию MRSA – у 20%, коагулазонегативными стафилококками, несущими ген *tesA* (MRCoNS), – у 54,7% (Таблица 1). Одновременная колонизация MRSA и MRCoNS была обнаружена у 17,9% больных. Эти данные, на наш взгляд, представляют интерес в плане дальнейших рассуждений о возможных резервуарах гена *tesA*. При повторном исследовании носоглоточных смывов у 21,1% пациентов установлена колонизация метициллинорезистентными стафилококками уже в условиях стационара.

В связи с выявлением высокого уровня колонизации

**Таблица 1.** Частота колонизации слизистой носа метициллинорезистентными стафилококками у онкологических больных при поступлении в хирургические отделения

Категории больных	Обследовано	Всего с геном <i>mecA</i>		В том числе MRSA		В том числе MRCoNS		В том числе MRSA+MRCoNS	
		абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Дети	15	7	46,7	1	6,7	7	46,7	1	6,7
Взрослые	130	75	57,7	28	21,5	72	55,4	25	19,2
Всего	145	82	56,6	29	20	79	54,5	26	17,9

слизистой оболочки носа метициллинорезистентными стафилококками и учитывая, что онкологические больные входят в группу риска по развитию послеоперационных осложнений, была изучена интенсивность колонизации отделяемого послеоперационных ран. Для этого мы исследовали отделяемое ран без всяких признаков их воспаления на 3-5 сутки после операции. Был установлен высокий уровень колонизации ран метициллинорезистентными стафилококками, преимущественно коагулазонегативными (Рисунок 1). MRSA был обнаружен в 16,3% образцов, а MRCoNS – в 44,2% образцов. Послеоперационные раны у больных с раком желудка были колонизированы метициллинорезистентными стафилококкам чаще, чем у пациентов с раком различных отделов толстого кишечника (22% против 11,4% для MRSA и 55,6% против 45,7% для MRCoNS).

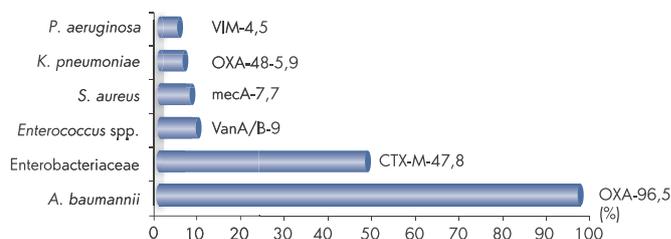
Среди медицинского персонала уровень носительства MRSA составил от 8,6 до 11,6%.

Было проведено изучение уровня колонизации слизистой ротоглотки грибами рода *Candida* у онкологических больных при поступлении в стационар (Таблица 2). Всего ДНК грибов рода *Candida* была обнаружена у 24,8% пациентов, в том числе у 17,9% детей и 27,9% взрослых. Чаще всего слизистая ротоглотки онкологических больных была колонизирована грибами *C. albicans* (17,6% в общей популяции, 10,3% у детей и 20,9% у

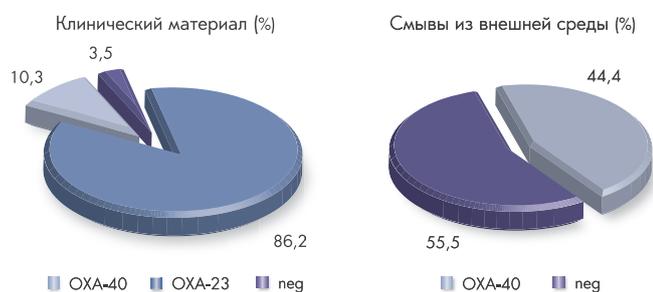
взрослых). У 2,4% больных одновременно была обнаружена ДНК *C. albicans* и *C. krusei*. ДНК *C. glabrata* была обнаружена только у взрослых (3,5% от числа обследованных). При анализе видовой структуры было установлено, что 27,3% относится к не-*albicans* видам, что, безусловно, необходимо учитывать при выборе противогрибковой терапии.

При получении культур микроорганизмов, относящихся к «проблемным», проводилось определение наиболее значимых генетических детерминант резистентности методом ПЦР-РВ (Рисунок 2).

Ванкомицинорезистентные энтерококки были обнаружены в 9%, MRSA – в 7,7% образцов клинического материала. Частота обнаружения генов ESBL класса CTX-M у изолятов семейства Enterobacteriaceae составила 47,8%. Чаще, чем у других возбудителей, они были обнаружены у изолятов *Escherichia coli* (60%). Гены класса TEM были обнаружены у 43,5% изолятов семейства Enterobacteriaceae. Гены карбапенемаз OXA-48 были обнаружены у двух изолятов *Klebsiella pneumoniae* (5,9%): один выделен из венозного катетера, второй – из отделяемого послеоперационной раны. У двух изолятов *Pseudomonas aeruginosa* был обнаружен ген группы VIM (4,5%): один выделен из мочи, второй – из мокроты. Генов, кодирующих продукцию карбапенемаз группы KPC, металло-бета-лактамаз групп IMP и NDM, у изоля-

**Рисунок 1.** Частота колонизации MRSA и MRCoNS отделяемого ран без признаков воспаления у больных с раком желудка и раком толстого кишечника**Рисунок 2.** Частота выявления генов приобретенной резистентности проблемных микроорганизмов в клиническом материале у онкологических больных**Таблица 2.** Частота колонизации слизистой ротоглотки грибами рода *Candida* у онкологических больных при поступлении в стационар

Категории больных	Обследовано	ДНК <i>Candida</i> spp.		ДНК <i>C. albicans</i>		ДНК <i>C. glabrata</i>		ДНК <i>C. krusei</i>		ДНК <i>C. albicans</i> + <i>C. krusei</i>	
		абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Дети	39	7	17,9	4	10,3	0	0	2	5,1	1	2,6
Взрослые	86	24	27,9	18	20,9	3	3,5	2	2,3	2	2,3
Всего	125	31	24,8	22	17,6	3	2,4	4	3,2	3	2,4



**Рисунок 3.** Распространенность генов OXA-подобных карбапенемаз среди изолятов *Acinetobacter* spp.

тов грамотрицательных бактерий обнаружено не было. Основная доля культур *A. baumannii* была изолирована из раневого отделяемого (58,6%) и отделяемого нижних дыхательных путей (32,8%). Единичные культуры были выделены из образцов плевральной жидкости, крови, венозного катетера. Была установлена преимущественная циркуляция штаммов, несущих гены, ответственные за продукцию OXA-40 карбапенемаз (86,2%).

Наличие генов OXA-40 было установлено также у культур *Acinetobacter* spp., изолированных из смывов внешней среды стационара, выполненных в рамках производственного контроля (Рисунок 3). Можно предположить, что штаммы *Acinetobacter* spp., циркулирующие во внешней среде, могут служить резервуаром генов OXA-карбапенемаз.

Учитывая широкую распространенность продуцирующих карбапенемазы штаммов *A. baumannii* среди онкологических больных, была изучена частота колонизации этим возбудителем слизистой ротоглотки и прямой кишки пациентов при поступлении в стационар. Молекулярный маркер *A. baumannii* (ген OXA-51) был обнаружен у 39 (20%) больных, в том числе у 28 (12,2%) в мазках со слизистой ротоглотки, у 11 (8%) больных в мазках со слизистой прямой кишки.

Гены OXA-карбапенемаз были выявлены у 14 больных (6,1% из числа обследованных и 35,9% из колонизированных *A. baumannii*), в том числе в мазках из ротоглотки у 13 (5,7% и 46,4% соответственно), в ректальных мазках у одного (0,7% и 25,6% соответственно). Чаще других были обнаружены гены OXA-40 карбапенемаз (20,5%, в том числе в мазках из ротоглотки – 25,0%, в ректальных мазках – 9,1%). В про-

веденном ранее исследовании [10] было показано, что основным клиническим проявлением инфекции, вызванной *A. baumannii*, в онкологическом стационаре была пневмония, большинство изолятов имели ген OXA-40 карбапенемаз. Эти данные коррелируют с полученной информацией о преимущественной колонизации слизистой ротоглотки *A. baumannii*, несущими гены OXA-40 карбапенемаз.

Примечательно, что ДНК OXA-карбапенемаз была обнаружена не только в образцах с геном OXA-51 (маркер *A. baumannii*), но и в образцах без него. С учетом всех образцов клинического материала, имеющих ген OXA-51 и без него, генетические детерминанты резистентности были обнаружены у 50 больных (21,7%). В материале из ротоглотки гены OXA-карбапенемаз были обнаружены у 37 из 230 больных (16,1%), в ректальных мазках – у 10 из 138 (7,2%), одновременно в ротоглотке и прямой кишке – у 3 (2,2%). Менее 1% больных были носителями двух генов одновременно (Таблица 3). Ген OXA-23 был обнаружен у 5 пациентов (2,2%), OXA-40 – у 22 пациентов (9,6%), OXA-58 – у 25 пациентов (10,9%); таким образом, гены OXA-40 и OXA-58 были распространены среди онкологических больных одинаково часто. Было установлено, что OXA-40 чаще выявлялись при абдоминальной патологии (14,9%), OXA-58 – при патологии мягких тканей/молочной железы (12,5%) и женских репродуктивных органов (22,7%). Пока неясно, имеют ли эти данные клиническое значение или являются отражением эпидемической ситуации в конкретном стационаре.

Выявление особенностей спектра возбудителей и анализ данных по чувствительности микроорганизмов служат основой для разработки и своевременной коррекции протоколов профилактики и антибактериальной терапии инфекционных осложнений. В этой ситуации не вызывает сомнений необходимость внедрения современных достижений молекулярной биологии в систему надзора за антибиотикорезистентностью.

В проведенном нами исследовании при последующем наблюдении за больными в послеоперационном периоде не было зарегистрировано случаев бактериемии или клинически манифестных осложнений, вызванных *A. baumannii*. В то же время, мы считаем, что детекция бессимптомного носительства продуцирующих карбапенемазы возбудителей с использованием ПЦР-РВ в дальнейшем может стать эффективным инструментом профилактики послеоперационных осложнений, особенно у иммунокомпрометированных пациентов.

**Таблица 3.** Частота обнаружения генов OXA-карбапенемаз *A. baumannii* перед госпитализацией у онкологических больных

Гены OXA-карбапенемаз	Мазки из ротоглотки (n=230)		Ректальные мазки (n=138)		Оба локуса (n=138)		Всего больных (n=230)	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
OXA-23	4	1,7	0	0	0	0	4	1,7
OXA-40	18	7,8	2	1,4	1	0,7	21	9,1
OXA-58	13	5,7	8	5,8	2	1,4	23	10
OXA40+58	1	0,43	0	0	0	0	1	0,4
OXA23+58	1	0,43	0	0	0	0	1	0,4
Всего	37	16,1	10	7,2	3	2,2	50	21,7

## Заключение

Использование молекулярных методов помогает осуществлять эффективный надзор за распространением микроорганизмов с ферментативными механизмами антибиотикорезистентности, имеющими тенденцию к широкому распространению в условиях стационара. В данном исследовании был установлен высокий уровень микробной колонизации онкологических больных, в том числе микроорганизмами, имеющими гены, кодирующие продукцию бета-лактамаз. Уже при поступлении в стационар 56,6% онкологических больных были колонизированы метициллинорезистентными стафилококками, 20% – *A. baumannii*, 24,8% – *Candida* spp. Из числа колонизированных *A. baumannii*, 35,9% имели гены OXA-карбапенемаз. Скрининг не только MRSA, но и MRCoNS при

поступлении в стационар позволяет быстро организовать разграничительные мероприятия, а также, в случае необходимости проведения антибактериальной терапии, выбирать препараты с активностью в отношении MRSA. По нашему мнению, аналогичные мероприятия целесообразно проводить и в случае выявления бессимптомного носительства штаммов *A. baumannii*, продуцирующих карбапенемазы. Молекулярные методы позволяют быстро получить результат и могут быть рекомендованы в случаях необходимости принятия срочного решения о проведении антибиотикотерапии.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература

1. The national concept of prevention of infections associated with the provision of medical care, and information material on its provisions. Pokrovskiy V.I., Akimkin V.G., Briko N.I., et al. Nizhniy Novgorod: Remedium Povolzh'e; 2012. 84 p. Russian. (Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и информационный материал по ее положениям. Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И. и соавт. Н. Новгород: Ремедиум Поволжье; 2012. 84 с.).
2. Ludupova E.Yu. Healthcare risk management as a basis for safe healthcare practice at a multidisciplinary hospital. Vestnik Roszdravnadzora. 2015;2:56-59. Russian. (Лудупов Е.Ю. Управление медицинскими рисками как основа обеспечения безопасности медицинской деятельности в многопрофильном стационаре. Вестник Росздравнадзора. 2015;2:56-59.).
3. Health and Safety Executive. Risk assessment. A brief guide to controlling risks in the workplace. Available at: [www.hse.gov.uk/pubns/indg163.pdf](http://www.hse.gov.uk/pubns/indg163.pdf).
4. Razumova D.V. Microbiological monitoring in a complex of measures to ensure infectious safety in a multidisciplinary hospital. PhD thesis. St. Petersburg; 2015. 24 p. Russian. (Разумова Д.В. Микробиологический мониторинг в комплексе мероприятий по обеспечению инфекционной безопасности в многопрофильном стационаре: автореферат дис. ... канд. мед. наук: Санкт-Петербург; 2015. 24 с.).
5. Polukhina O.V. Microbiological monitoring of pathogens of infectious complications in immunocompromised patients. PhD thesis. St. Petersburg; 2015. 21 p. Russian. (Полухина О.В. Микробиологический мониторинг возбудителей инфекционных осложнений у иммунокомпрометированных пациентов: автореферат дис. ... канд. мед. наук: Санкт-Петербург; 2015. 21 с.).
6. Sokolov A.A. Microbiological monitoring in the system of prevention and treatment of HAI in cancer hospital. PhD (Doctorate) thesis. Moscow; 2009. 147 p. Russian. (Соколов А.А. Микробиологический мониторинг в системе профилактики и лечения ВБИ в онкологическом стационаре: диссертация ... д-ра мед. наук: Москва; 2009. 147 с.).
7. Priputnevitch T.V., Melkumyan A.R., Burmenskaya O.V., et al. Use of MALDI-TOF Mass-Spectrometry and Quantitative PCR for Rapid Diagnosis of Sepsis. Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija. 2014;16(1):4-9. Russian. (Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р., Бурменская О.В. и соавт. Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014;16(1):4-9.).
8. Zykova T.A., Shevchenko A.N., Khomutenko I.A., et al. Experience in the use of molecular techniques in diagnosis of infectious complications in cancer patients. Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij. 2015;10:840-844. Russian. (Зыкова Т.А., Шевченко А.Н., Хомутенко И.А. и соавт. Опыт применения молекулярных методов в диагностике инфекционных осложнений у онкологических больных. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015;10:840-844).
9. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2015. Available at: <http://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data.pdf>.
10. Zykova T.A., Tumanyan S.V., Bogomolova O.A., Panova N.I. Etiology of pneumonias in cancer hospital. Problemy medicinskoj mikologii. 2015;17(2):76. Russian. (Зыкова Т.А., Туманян С.В., Богомолова О.А., Панова Н.И. Этиология пневмоний в онкологическом стационаре. Проблемы медицинской микологии. 2015;17(2):76.).