

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ В СИСТЕМЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ЛЕЧЕБНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

TOPICAL PROBLEMS OF DIAGNOSTICS OF INFECTIONS ASSOCIATED WITH HEALTH CARE DELIVERY IN THE SYSTEM OF EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE MEDICAL ORGANIZATIONS

E. Kurakin

Summary. As is known, during the stages of recognition and detection of cases of infections associated with health care (HCAI) the main objectives are to microbiological confirmation and accurate identification of the pathogen. At subsequent stages it is necessary typing and using the results to characterize the outbreak, that is, to establish the source and mechanisms of transmission of pathogens of ISMP and its reservoirs. Finally, the stages of anti-epidemic measures in a microbiological laboratory is monitoring their effectiveness and developing a system of early warning of ISMP. Thus, the typing of strains of causative agents of HCAI is an essential part of the laboratory of clinical Microbiology in epidemiological analysis of hospital infections. Methods of typing of ISMP is divided into pheno — and genotypic.

Keywords: infection, laboratory, HCAI, DNA.

Куракин Эдуард Станиславович

К.м.н., доцент,

Тульский государственный университет

79105504113@yandex.ru

Аннотация. Как известно, на этапах распознавания и выявления случаев инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) главные задачи состоят в микробиологическом подтверждении и точной идентификации возбудителя. На последующих этапах необходимо его типирование и использование результатов для характеристики вспышки, то есть для установления источника и механизмов передачи возбудителей ИСМП и ее резервуаров. Наконец, на этапах противоэпидемических мероприятий микробиологической лабораторией осуществляется контроль их эффективности и разрабатывается система раннего предупреждения ИСМП. Таким образом, типирование штаммов возбудителей ИСМП является существенной частью работы лаборатории клинической микробиологии при эпидемиологическом анализе госпитальных инфекций. Методы типирования ИСМП делят на фено- и генотипические.

Ключевые слова: инфекция, лаборатория, ИСМП, ДНК.

Фенотипические методы — это методы, с помощью которых определяется характеристика, экспрессируемая микроорганизмами. Генотипические методы представляют собой методы исследования структуры ДНК.

Основой типирования является положение, суть которого состоит в том, что клонально родственные изоляты имеют определенную характеристику, или признаки, посредством которых они могут быть дифференцированы от неродственных изолятов. Изолят в данном понимании — это отдельная колония, которая происходит от единственной микробной клетки. Штамм — это набор изолятов, которые при анализе с помощью любых методов типирования неотличимы друг от друга, но могут быть дифференцированы от других изолятов.

К первой группе маркеров относятся нуклеотидные последовательности, являющиеся специфическими сайтами для эндонуклеаз рестрикции. К данным методам относятся старые классические методы — исследование полиморфизма длины рестрикционных

фрагментов (ПДРФ) хромосомной и плазмидной ДНК, саузерн-блоттинг, пульс-электрофорез (ПЭ), а также ряд методов ПЦР-типирования — ПЦР-ПДРФ, AFLP-ПЦР. Данные методы основаны на том, что локализация сайтов распознавания эндонуклеаз рестрикции может быть полиморфной от штамма к штамму. Таким образом, термин ПДРФ отражает полиморфную природу локализации сайтов распознавания эндонуклеаз рестрикции.

Первым и до настоящего времени наиболее распространенным среди генотипических методов исследования, основанным на определении ПДРФ ДНК, остается плазмидный анализ. При длительном использовании плазмидного анализа в исследовании ИСМП выявлено два основных недостатка данного метода. Во-первых, плазмиды могут теряться как спонтанно, так и легко приобретаться штаммом хозяина, и в таких случаях эпидемиологически родственные изоляты могут иметь различные плазмидные профили. Во-вторых, многие клинические изоляты способны терять плазмиды, в связи с чем они становятся нетипируемыми при использовании плазмидного анализа [6; 7; 15; 19].

Однако, несмотря на указанные недостатки, плазмидный анализ остается полезным и эффективным методом, прежде всего при оценке изолятов, получаемых в ограниченный отрезок времени в определенном месте, например во время острой вспышки инфекции в больнице или в одном из ее отделений. ПЭ хромосомной ДНК [13; 16] считается «золотым стандартом» типирования многих видов патогенных микроорганизмов. Результаты исследований показали высокую разрешающую силу ПЭ, а в ряде случаев — его преимущество в сравнении с большинством фено- и генотипических методов.

С помощью компьютеризированной системы сканирования гелей и разработки программ стало возможным создание банка данных профилей ПЭ для всех микроорганизмов. В настоящее время стало возможно передавать информацию о фингерпринтинге ДНК возбудителей пищевых инфекций в FoodNet сайты, получаемые с помощью ПЭ в целях установления источника инфекции и создания электронной сети для быстрого сравнения фингерпринтов.

Много новой информации о генетической структуре популяций возбудителей инфекций получено с помощью рестрикционного анализа хромосомной ДНК возбудителей и его варианта — саузерн-блот анализа [4], в котором для облегчения учета в качестве маркера используются зонды [14]. В саузерн-блоте типирование осуществляется как бы по двум молекулярным маркерам: по сайтам рестрикции эндонуклеаз и по присутствию в рестрицированных фрагментах специфических нуклеотидных последовательностей, тестируемых с помощью зондов.

Наиболее распространенным вариантом саузерн-блот анализа является риботипирование [6; 12], в котором в качестве зондов выступают нуклеотидные последовательности генов 16S и 23S рРНК и гипервариабельные нуклеотидные последовательности, рассеянные по геному многих патогенных видов бактерий.

В конце 90-х годов для типирования патогенных микроорганизмов были разработаны и стали широко использоваться два варианта ПЦР, принципы которых подробно рассмотрены в обзорах [3; 17].

Ко второй группе молекулярных маркеров, используемых для типирования, относятся IS-элементы и повторяющиеся нуклеотидные последовательности, которые рассеяны по геному. Их расположение в хромосоме может варьировать от штамма к штамму. К методам типирования на основе ПЦР, в которых амплифицируются повторяющиеся последовательности, относятся Rep-ПЦР и RAPD-ПЦР. В разработанной J. Versalovic и другими исследователями Rep-ПЦР [18] амплифицируются повто-

ряющиеся (repetitive) нуклеотидные последовательности, рассеянные по геномной ДНК [9]. Для типирования используются две основные последовательности повторяющихся элементов — повторяющиеся экстрагенные палиндромные элементы (ПЭПЭ) и внутригенные постоянные последовательности (ВПП). Оба варианта имеют хорошую разрешающую силу на штаммовом уровне, в связи с чем Rep-ПЦР становится наиболее широко используемым методом ДНК-типирования.

ПП-ПЦР или ПЦР с использованием произвольных праймеров (RAPD) можно отнести к третьей группе молекулярных маркеров или «случайных» повторов, метод основан на использовании коротких произвольных олигонуклеотидных праймеров длиной 9–10 нп, которые гибридизуются с ДНК-мишенью при низкой температуре отжига. В данном варианте ПЦР-типирования короткие праймеры и низкая температура отжига используются для инициации амплификации нуклеотидных последовательностей в различных областях генома [3; 5].

К четвертой группе молекулярных маркеров можно отнести маркеры, основанные на конформационных изменениях однонитчатой ДНК, когда в тестируемой нуклеотидной последовательности наблюдаются точковые мутации. Эти точковые мутации способны изменять конформацию в однонитчатых ДНК, которую можно тестировать в электрофорезе по различной подвижности конформационно отличающихся однонитчатых ДНК. Два метода — ПЦР-SSCP (single stranded conformational polymorphism) и CFLP-ПЦР, основанные на этом принципе, все шире используются для типирования патогенных микроорганизмов [10].

В настоящее время для ряда эпидемиологических исследований существует необходимость исследовать патогенные штаммы, находящиеся в различном физиологическом состоянии, например в обычной или некультивируемой форме, при изучении влияния какого-либо химического соединения на экспрессию генов патогенности, устойчивости, выявлении генетических отличий штаммов, вызывающих разные формы инфекции (острая или персистирующая), циркулирующих в окружающей и больничной среде, и т.д. Один из оптимальных подходов — получение «молекулярных портретов», что позволяет установить генетические отличия у сравниваемой пары штаммов и не сходные (отличные) фрагменты далее выделять, клонировать и устанавливать их роль в изучаемом явлении. В настоящее время разрабатываются технологии на основе одновременного секвенирования нескольких генов, что увеличивает разрешающую силу таких методов и, следовательно, позволяет получать значительно более объективные и достоверные результаты. И хотя данные технологии еще несколько лет будут за пределами доступности практических микро-

биологических лабораторий, их будущее чрезвычайно привлекательно. Однако, методы секвенирования ДНК пока недоступны для практических лабораторий, так как требуют не только дорогостоящего оборудования, но и специальных знаний и навыков на этапах выполнения исследования.

Таким образом, можно констатировать, что на выбор метода влияют несколько факторов. Суть в том, что микробиологическая лаборатория должна быть готова осуществлять анализ изолятов фактически всех видов возбудителей, вызывающих ИСМП. В соответствии с этим выбранный метод должен обеспечивать тестирование максимального круга возбудителей. Используемый метод должен обладать высокой воспроизводимостью и разрешающей силой, а получаемые результаты — легко учитываться и интерпретироваться без привлечения дополнительной экспертизы. Выбор метода должен основываться на данных литературы, свидетельствующих о его эффективности при использовании в других лабораториях. И, наконец, при выборе молекулярно-генетических методов необходимо учитывать стоимость не только первоначального основного оборудования, но и дополнительного, а также стоимость реактивов на проведение постоянных исследований.

Представляется, что оптимальным для лаборатории является внедрение в ее практику как минимум двух доступных методов. Наиболее экономичным вариантом для типирования возбудителей госпитальных инфекций являются рестрикционный анализ плазмид (РАП), так как многие возбудители ИСМП являются плазмидо-содержащими видами, а также рестрикционный анализ ампликонов (ПЦР-ПДРФ), получаемых в ПЦР. При этом оборудование для ПЦР может использоваться не только для типирования, но и для индикации возбудителей инфекций. Может использоваться также РАП в комплексе с ПЭ, характеризующимся высокой разрешающей силой и хорошей воспроизводимостью. Однако последний метод является дорогостоящим.

С помощью эпидемиологического и микробиологического мониторинга выявляется вспышка, как правило, при росте показателей инфекций, вызываемых определенными видами в конкретном стационаре, выделении одного и того же вида микроорганизмов у больных или при выявлении изолятов, имеющих другие биотипы или спектры устойчивости к антимикробным препаратам при сравнении с циркулировавшими ранее в больнице штаммами.

Таким образом, постоянный эпидемиологический мониторинг и рутинная лабораторная оценка изолятов являются практическими эпидемиологическими инструментами мониторинга, ведущая роль в котором

принадлежит микробиологической лаборатории. Когда наличие внутрибольничной вспышки подтверждается результатами эпидемиологических исследований, тогда использование молекулярных методов типирования должно подтвердить, что изоляты, выделенные в период вспышки, представляют собой единственный штамм, послуживший ее причиной. В такой последовательности и используется метод типирования для того, чтобы подтвердить обоснованность клинической или эпидемиологической гипотезы. В длительно продолжающихся вспышках, а также в случаях ИСМП, когда наблюдается изменчивость штаммов, выявляемая фенотипическими методами исследования, желательнее использовать молекулярные методы типирования, характеризующиеся высокой воспроизводимостью и разрешающей силой.

Ключевой аспект состоит в том, что эпидемиологические выводы должны прежде всего основываться на эпидемиологических данных. Результаты же использования молекулярных методов типирования должны подтвердить эти выводы или изменить предварительно выдвинутую гипотезу и направить исследование в новое русло.

Проведенные в последнее десятилетие исследования показали, что использование методов, обладающих высокой разрешающей силой, может значительно расширить наши представления о ИСМП. Общеизвестно, что острые вспышки ИСМП вызываются единственным штаммом и что они отличаются от спорадических случаев заболеваний, не связанных со вспышкой [4; 11]. В ряде исследований изолятов, представляющих или острые кластеры, или эндемическую персистенцию, документально показано присутствие множества различных штаммов одного вида в лечебных организациях [8]. Эти примеры свидетельствуют о существенной значимости методов типирования при анализе сложного эпидемиологического процесса.

ПЭ наиболее эффективный метод дифференциации изолятов *E.coli*. Соответственно он обладает большей разрешающей силой, чем МЭЭ или риботипирование [6]. Это показано при типировании изолятов, выделенных от больных пиелонефритами, а несколько позднее — при анализе 160 изолятов, выделенных из крови больных в Массачусетсе и Калифорнии (США) и Найроби (Кения) [11]. Хотя имеется значительно меньше данных о типировании других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, однако показано, что ПЭ высокоэффективен при дифференциации изолятов видов родов *Klebsiella* и *Enterobacter* [11].

Серотипирование остается основной характеристикой в типировании изолятов бактерий рода *Salmonella* и, как показано, хорошо коррелирует с различными генетиче-

скими линиями [6; 20]. Удовлетворительные результаты получены и при использовании ПП-ПЦР типирования для анализа фенотипически идентичных изолятов *S. enteritidis*, выделенных в ограниченный период в одном из отделений 1-й инфекционной больницы Москвы. Первоначальное предположение о внутрибольничной вспышке после генетического типирования не подтвердилось, так как штамм, выделенный от предполагаемого источника, сотрудника пищеблока, без клинических проявлений сальмонеллеза, оказался генотипически отличным от штаммов *S. enteritidis*, выделенных от больных сальмонеллезом, поступивших в больницу из разных районов Москвы. Высказано предположение, что, возможно, в Москве циркулирует штамм *S. enteritidis* определенного генотипа, способный вызвать острую кишечную инфекцию.

Таким образом, использование молекулярных методов типирования возбудителей должно стать мощным подспорьем в работе госпитальных эпидемиологов при реализации программ борьбы с ИСМП, а также врачей при лечении госпитализированных больных. В будущем молекулярно-генетическое типирование, вероятно, станет рутинным методом в микробиологических лабораториях.

В связи с увеличением числа видов микроорганизмов, способных вызывать ИСМП, и трудностями не только их типирования, но и идентификации, далеко не каждая микробиологическая лаборатория больницы или клиники способна корректно идентифицировать и типировать возбудителей ИСМП. Поэтому в системе эпидемиологического контроля за ИСМП должны быть созданы референс-лаборатории, специалисты которых владели бы современными методами идентификации и дифференциации возбудителей ИСМП. С учетом рассмотренных положений они должны работать в тесном взаимодействии с клиницистами и госпитальными эпидемиологами над решением разнообразных проблем ИСМП.

Кроме того, одной из основных задач таких референс-лабораторий должно являться внедрение в практику новых экономичных методов идентификации и типирования. При внедрении такой программы в практику здравоохранения можно будет надеяться не только на успех в борьбе с ИСМП, но также и на решение фундаментальных и прикладных проблем микробиологии и эпидемиологии этих инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геймерлинг В. Э., Меладзе Р. Д. Этиология и антибиотикорезистентность микроорганизмов, выделенных у пациентов с раневыми инфекциями // Молодежь и наука: шаг к успеху: сборник научных статей Всероссийской научной конференции перспективных разработок молодых ученых: в 3-х томах. — 2017. — С. 232–235.
2. Скала Л. З., Сидоренко С. В., Нехорошева А. Г. и др. Практические аспекты современной клинической микробиологии. — М., 1997.
3. Шагинян И. А., Гинцбург А. Л. ПЦР-генетическое типирование возбудителей бактериальных инфекций // Генетика. — 1995. — № 31. — С. 600–610.
4. Шагинян И. А., Першина М. Ю. Генетические маркеры в эпидемиологии бактериальных инфекций // Журн. Микробиол. — 1997. — № 4. — С. 54–59.
5. Arbeit R. D., Maslow J. N., Mulligan M. E. Polymerase chain reaction-mediated genotyping in microbial epidemiology. *Clin Infect Dis* 1994; 18:1018–9.
6. Arbeit R. D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms // *Manual Clin. microbiol.* — ASM Press; 1996. — P. 190–208.
7. Archer G. L., Karchmer A. W., Vishniavsky N., et al. Plasmid-pattern analysis for the differentiation of infecting from non-infecting *Staphylococcus epidermidis* // *J Infect Dis* — 1984. — Vol. 149. — P. 913–920.
8. Barbier N., Saulnier P., Chachaty E., et al. Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci // *J. Clin. Microbiol.* — 1996. — Vol. 34. — P. 106–109.
9. Hulton C. S., Higgins C. F., Sharp P. M. ERIC sequences: a novel family of Repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria // *Mol. Microbiol.* — 1991. — Vol. 5. — P. 825–834.
10. Maddox L. O., Li P., Bennett A., et al. Comparison of SSCP analysis for mutation detection in the human iduronate 2-sulfatase gene // *Biochem. Mol. Biol. Int.* — 1997. — Vol. 43. — P. 1163–1171.
11. Maslow J. N., Brecher S., Adams K. S. et al. Relationship between indole production and the differentiation of *Klebsiella* species: indole-positive and negative isolates of *Klebsiella* determined to be clonal // *J. Clin. Microbiol.* — 1993. — Vol. 31. — P. 2000–2003.
12. Olsen G. J., Woese C. R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny // *FASEB.* — 1993. — Vol. 7. — P. 113–123.
13. Schwartz D. C., Cantor C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis // *Cell.* — 1984. — Vol. 37. — P. 67–75.
14. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // *J. Mol. Biol.* — 1975. — Vol. 98. — P. 503–517.
15. Stanley J., Baquar N., Threlfale E. J. Genotypes and phylogenetic relationships of *Salmonella typhimurium* are defined by molecular fingerprinting of IS200 and 16S rrrn loci // *J. Clin. Microbiol.* — 1993. — Vol. 139. — P. 1133–1140.
16. Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing // *J. Clin. Microbiol.* — 1995. — Vol. 33. — P. 2233–2239.
17. Van Belcum A. *Clin. Microbiol. Rev.* — 1994. — Vol. 7. — P. 174–184.
18. Versalovic J., Kapur V., Koeuth T., et al. DNA fingerprinting of pathogenic bacteria by fluorophore-enhanced Repetitive sequence-based polymerase chain reaction // *Arch. Pathol. Lab. Med.* — 1995. — № 119. — P. 23–29.

19. Wachsmuth K. Genotypic approaches to the diagnosis of bacterial infections: plasmid analyses and gene probes // Infect. control. — 1985. — Vol.6. — № 3. — P. 100–109.
20. Wu Shi-xiao, Tang Yi. Molecular epidemiologic study of an outbreak of salmonella typhimurium infection at a newborn nursery // Clin. Med. J. — 1993. — Vol. 106, № 6. — P. 423–427.

© Куракин Эдуард Станиславович (79105504113@yandex.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Тулский государственный университет