

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТОВ У НЕЙРОХИРУРГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Савочкина Ю.А.<sup>1</sup>, Александрова И.А.<sup>2</sup>, Ершова О.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН ЦНИИ эпидемиологии

<sup>2</sup> ФГБУ НИИ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко

- ❑ Методика выявления основных возбудителей нозокомиальных инфекций (НИ) и ключевых генетических маркеров антибиотикорезистентности с помощью ПЦР в реальном времени
- ❑ Оценка эффективности использования данной методики при диагностике интракраниальных гнойно-воспалительных осложнений у нейрохирургических больных

# Возможности использования молекулярных методов при диагностике НИ

---

- Критически важно: быстрое, эффективное и достоверное выявление основных бактериальных возбудителей НИ и маркеров их антибиотикорезистентности
- Стандартные бактериологические методы требуют 2-3 суток для идентификации и определения АБ-чувствительности МО
- Повысить эффективность и скорость диагностики может использование молекулярных методов, обладающих высокой чувствительностью и сокращающих до нескольких часов время получения основной информации о возбудителе инфекции

# Основные молекулярные методы

---

- ПЦР и ПЦР в режиме реального времени
- Секвенирование ДНК
- Масс-спектрометрия

## ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

- Позволяет максимально сократить время получения результатов (до нескольких часов), не требует проведения культивирования
- Наиболее широко используется в практике лабораторной диагностики

# ПЦР в реальном времени – наиболее широко используемый молекулярный метод

---

- ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) - эффективный метод выявления различных бактериальных, вирусных и грибковых патогенов  
(в частности, ПЦР - золотой стандарт для диагностики инфекций ЦНС, вызванных HSV-1,2, энтеровирусами)
- Существуют и используются методики и наборы реагентов, основанные на ПЦР-РВ, в том числе, для выявления отдельных возбудителей НИ и маркеров АБ-резистентности
- Разрабатываются методики для создания интегральной системы диагностики НИ на основе ПЦР-РВ и секвенирования

# ПЦР в реальном времени: ограничения метода

---

## Каковы ограничения метода?

- Анализируется ограниченный спектр возбудителей инфекций, включенных в панель (для максимального расширения спектра возможно включение секвенирования ДНК)
- Анализируется ограниченный спектр маркеров антибиотикорезистентности (нельзя полностью заменить определение антибиотикочувствительности)
- Требуется изучения вопрос выбора критериев для оценки эффективности лечения бактериальных менингитов по результатам ПЦР (количественный анализ – определяется снижение содержания ДНК возбудителя в ликворе на 2-3 порядка)

# Методика выявления ДНК возбудителей НИ на основе мультиплексной ПЦР-РВ

Грам(+) и

энтеробактерии

- *Staphylococcus spp.*
- *Streptococcus spp.*
- *Enterococcus spp.*
- *Enterobacteriaceae*

Грам(-)

- *Acinetobacter baumannii*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *E.coli*

Bacteriaceae

Candida spp

- *C.albicans*
- *C.glabrata*
- *C.krusei*
- *C.parapsilosis,*  
*C.tropicalis*

ГНФ /Ab-OXA

- *S.maltophilia* (MBL)
- Ab-OXA (-23, 58, 40)
- *Acinetobacter spp.*

MDR G(-)

- MBL
- KPC / OXA-48
- CTX-M ESBL

MRSA

- mecA
- *S. aureus*

Энтеробактерии

- *Serratia marcescens*
- *Enterobacter spp*
- *Proteus spp*
- *Citrobacter spp*

- *Streptococcus pneumoniae*
- *S. pyogenes*
- *Enterococcus faecium* /*E. faecalis*

Bacteriaceae:

Pos / ID-? →  
Секвенирование  
ДНК (гены 16S рРНК)

# Используемые при проведении исследования мультиплексные ПЦР-тесты

Грам(+) и  
энтеробактерии

- *Enterobacteriaceae*
- *Staphylococcus spp.*
- *Streptococcus spp.*
- *Enterococcus spp.*

Грам(-)

- *Acinetobacter baumannii*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *E.coli*

Bacteriaceae

Candida spp

- *C.albicans*
- *C.glabrata*
- *C.krusei*
- *C.parapsilosis,*  
*C.tropicalis*

ГНФ /Ab-OXA

- *S.maltophilia* (MBL)
- Ab-OXA (-23, 58, 40)
- *Acinetobacter spp.*

MDR G(-)

- MBL
- KPC / OXA-48
- CTX-M ESBL

MRSA

- mecA
- *S. aureus*

Энтеробактерии

- *Serratia marcescens*
- *Enterobacter spp*
- *Proteus spp*
- *Citrobacter spp*

- *Streptococcus pneumoniae*
- *S. pyogenes*
- *Enterococcus faecium* /*E. faecalis*

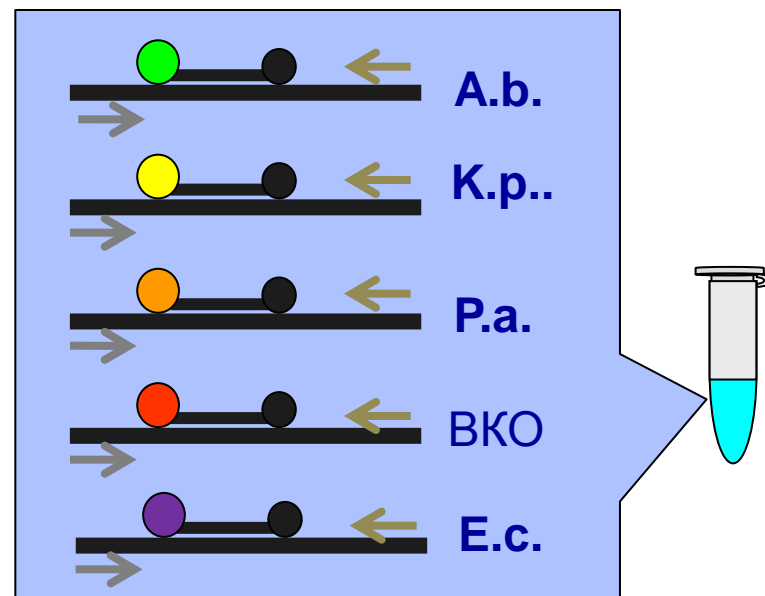
Bacteriaceae:  
Pos / ID-? →  
секвенирование



# Принцип действия методики выявления основных возбудителей НИ на основе ПЦР-РВ

Тест G(-) Ab/Kp/Pa/Ec:

- *Acinetobacter baumannii*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *E.coli*
- ВК (внутренний контроль)



- Формат мультиплексной ПЦР-РВ с детекцией ДНК-мишеней с помощью флуоресцентно-меченых зондов (TaqMan)
- Гены-мишени: гены группы *blaOXA51-like* - для *A. baumannii*, ген *oprL* - для *P. aeruginosa*, ген *uidA* - для *E.coli* и 16S-23S ITS-спейсер - для *K.pneumoniae*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Enterococcus spp*

# Методика выявления основных возбудителей НИ с помощью мультиплексной ПЦР-РВ

---

Материал для исследования: бактериальные культуры ликвора, положительные гемокультуры и др.

- экстракция ДНК - экспресс-метод (время - 20 мин, манипуляции – 5 мин)
- ПЦР-РВ (1ч 30 мин)

Общее время анализа – 2 часа

Материал для исследования: нативный ликвор

- Экстракция ДНК из осадка 1 мл ликвора (1 ч)
- ПЦР-РВ - тесты для выявления ДНК возбудителей инфекций и для выявления генов антибиотикорезистентности

Общее время анализа – 3-5 часов

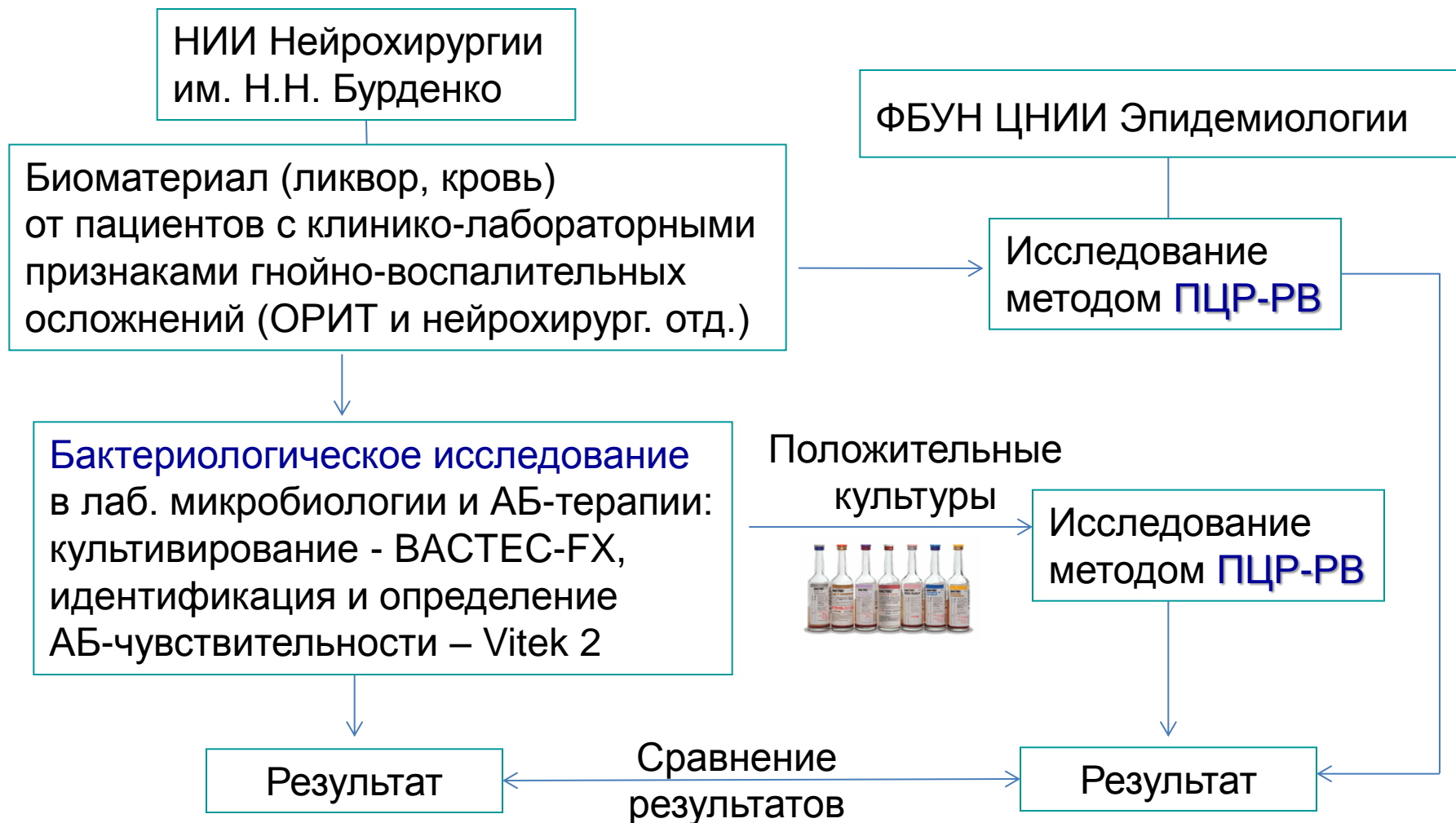
Результат – на 2-3 суток раньше результата бактериологич. исслед.

# Методика выявления основных возбудителей НИ с помощью мультиплексной ПЦР-РВ

---

- Аналитическая чувствительность:
  - 200 геномов в 1 мл (ГЭ/мл) - при выявлении ДНК-мишеней в образцах нативного ликвора,
  - $2 \times 10^5$  ГЭ/мл при выявлении ДНК-мишеней в образцах культур ликвора и гемокультур
- Аналитическая специфичность:
  - подтверждается как результатами тестирования панели контрольных штаммов и изолятов 35 различных видов МО, так и результатами сравнения нуклеотидных последовательностей выбранных праймеров и зондов с коллекцией нуклеотидных последовательностей ДНК различных МО, опубликованных в базе данных NCBI

# Исследование по оценке эффективности методики для диагностики послеоперационных менингитов у нейрохирургических больных



# Алгоритм ПЦР-исследования

Образец ликвора

Тесты для выявления др. бактериальных возбудителей менингитов

*Haemophilus influenzae*,  
*N.meningitidis*

*Listeria monocytogenes*

МТС (*Mycobacterium tuberculosis complex*)

Другие тесты

Тесты для выявления основных возбудителей НИ

- Грам(-) *Ab/Kp/Pa/Ec*
- Грам(+) и энтеробактерии

Тесты для выявления генов АБ-резистентности

- MDR MBL, KPC/OXA-48
- MDR *Ab*-OXA
- MRSA

Секвенирование генов 16S рРНК

Тесты для выявления грибковых и вирусных инфекций ЦНС

*Candida spp*  
(5 видов)

HSV I/ II, VZV

EBV

РНК энтеровирусов

Другие тесты

# Мультиплексные ПЦР-тесты для выявления генов карбапенемаз

---

## MBL:

- VIM -группа
- IMP -группа
- NDM- группа
- ВК (внутренний контроль)

## КРС / ОХА-48:

- КРС -группа
- ОХА-48 -like
- ВК (внутренний контроль)

## ОХА-карбапенемазы

### *Acinetobacter spp.:*

- ОХА-23 -like
- ОХА-58 -like
- ОХА-40 -like
- маркер *A.baumannii* (ОХА-51 -like)

- ❑ Охватывают все основные группы карбапенемаз, имеющие распространение в России, Европе и/или глобальное распространение
- ❑ Доступны для практического применения

Разработаны и производятся  
ФБУН ЦНИИ эпидемиологии

# Результаты выявления основных возбудителей инфекции методом ПЦР-РВ

Выявление основных возбудителей инфекции в образцах положительных культур ликвора (N=60) и гемокультур (N=10)

Результаты ПЦР-тестов	Число образцов, N	Соответствие результатов ПЦР-РВ и бактериологич. исслед. N (%)
Обнаружен один из выявляемых Грам(-) МО	42	42 (100%)
Обнаружен один из выявляемых Грам(+) МО	26	26 (100%)
Обнаружены <i>Candida spp</i>	2	2
Всего	70	70 (100%)

Результаты идентификации возбудителей методом ПЦР-РВ и бактериологическим методом полностью совпадали

# Результаты выявления генов приобретенных карбапенемаз методом ПЦР-РВ

Выявление генов карбапенемаз в образцах положительных культур ликвора и гемокультур

Выявленный возбудитель	Число образцов, N	Выявлены гены карбапенемаз		
		Число образцов / пациентов	Группа карбапенемаз	S / R к карбапенемам (МПК)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	12	12 / 7	OXA-40-like	R (МПК >=16)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	7 / 3 *	OXA-48- -like *	R (МПК >=16)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	2 / 2	VIM	R (МПК >=16)
<i>E.coli</i>	1	0	-	-
Другие энтеробактерии	8	1 ** ( <i>E.aerogenes</i> )	OXA-48- -like	R / I

Бакт. культуры, полученные \* в 2011г, \*\* в 2014г



# Результаты выявления основных возбудителей инфекции методом ПЦР-РВ в образцах ликвора

Тестирование образцов нативного ликвора, N=130

Результаты ПЦР-тестов	Число образцов / пациентов (N / n)	Соответствие результатам бактериологич. исслед., N / n	ПЦР (+) / БИ (-) N / n	ПЦР (-) / БИ (+) N / n
НЕ обнаружено выявляемых МО	97 / 79	96 / 78 *	-	1
Обнаружен один из выявляемых МО	33 / 31	28 / 26	5 / 5 **	-
Обнаружен один из Грам(-) МО	25 / 24	21 / 20	4 / 4	-
Обнаружен один из Грам(+) МО	8 / 7	7 / 6	1 / 1	-

\* 1 образец – рост *Enterococcus faecalis* / ПЦР (-)

\*\* Содержание ДНК возбудителя – не более  $10^3$  геномов/мл, у 2 пациентов. бакт. посев выявил тот же МО позже

# Результаты выявления основных возбудителей инфекции методом ПЦР-РВ в образцах ликвора

Бактериальные возбудители инфекции, выявленные в образцах нативного ликвора (N=130)

Виды возбудителей	Число образцов
<i>Acinetobacter baumannii</i>	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
<i>E.coli</i>	4
<i>Enterobacteriaceae</i> ( <i>Serratia spp</i> , <i>Enterobacter spp</i> )	6

Виды возбудителей	Число образцов
<i>Staphylococcus spp</i>	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	1
<i>Streptococcus spp</i>	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
<i>Enterococcus spp.</i>	1
Другие	1

# Сравнение результатов методики на основе ПЦР-РВ и бактериологического исследования ликвора

---

Конкордантность результатов двух методов составила 95,4 %

Относительный показатель	Значение (95% ДИ)
Чувствительность ПЦР-РВ относительно БМ	96,6 % (82,2 - 99,9%)
Специфичность ПЦР-РВ относительно БМ	95,0% (88,7 - 98,4%)
NPV * (Предсказательное значение отрицательного результата)	99,0% (94,3 - 100%)
PPV * (Предсказательное значение положительного результата)	84,9 (68,1 - 94,9%)

\* Показатели рассчитаны, принимая бактериологический метод как стандарт

# Результаты выявления основных Грам(-) МО и генов карбапенемаз методом ПЦР-РВ

Тестирование образцов нативного ликвора, N=130

Результат теста G(-) Ab/Kp/Pa/Ec	Число образцов, N	Выявление генов карбапенемаз, N (группа)
Обнаружен один из выявляемых МО	18	8
Не обнаружено выявляемых МО	112	-
<i>A. baumannii</i>	7	7 (OXA-40)
<i>P. aeruginosa</i>	3	1 (VIM)
<i>K.pneumoniae</i>	5	0
<i>E.coli</i>	4	0

} Cp-R

Результаты ПЦР-РВ - в день получения образца - на 2-3 суток ранее результатов бактериологического исследования

# Заключение

---

- Разработанная методика на основе мультиплексной ПЦР-РВ позволяет быстро и эффективно выявлять ДНК основных бактериальных возбудителей инфекции при диагностике послеоперационных менингитов у нейрохирургических больных
- Использование данной методики, включающей выявление ключевых маркеров антибиотикорезистентности, позволяет в кратчайшие сроки получить информацию, необходимую для назначения адекватной АБ-терапии