

## ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*С.Н.Гаврилов, Т.С.Скачкова, О.Ю.Шипулина, Ю.А.Савочкина, Г.А.Шипулин, В.В.Малеев*

### **СОВРЕМЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СЕПСИСА**

Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

Этиологическая диагностика сепсиса представляет собой одну из наиболее сложных проблем современной медицины в связи с широким разнообразием возбудителей сепсиса, многие из которых являются компонентами нормальной микрофлоры человека. Недостатками современного «золотого стандарта» микробиологической диагностики этиологии сепсиса методом посева крови на стерильность являются длительность культивирования, ограничение в выявлении некультивируемых форм микроорганизмов, значительное влияние предварительной эмпирической антибиотикотерапии на результат анализа. Этих недостатков лишены методы молекулярной диагностики, активно разрабатываемые и внедряемые в последнее десятилетие. В обзоре рассмотрены основные современные методы молекулярно-биологической диагностики, приведены актуальные данные по их диагностической характеристике. Особое внимание уделено методам ПЦР-диагностики, включая новые российские разработки. В сравнительном аспекте рассмотрены методы гибридизации нуклеиновых кислот и протеомного анализа. Дана оценка применения и перспектив развития методов молекулярной диагностики сепсиса.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 91—99

Ключевые слова: сепсис, молекулярные методы, этиология сепсиса, методы молекулярной диагностики, ПЦР, ПЦР в реальном времени

*S.N.Gavrilov, T.S.Skachkova, O.Yu.Shipulina, Yu.A.Savochkina, G.A.Shipulin, V.V.Maleev*

### **CONTEMPORARY MOLECULAR-GENETIC METHODS USED FOR ETIOLOGIC DIAGNOSTICS OF SEPSIS**

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Etiologic diagnostics of sepsis is one of the most difficult problems of contemporary medicine due to a wide variety of sepsis causative agents, many of which are components of normal human microflora. Disadvantages of contemporary «golden standard» of microbiologic diagnostics of sepsis etiology by seeding of blood for sterility are duration of cultivation, limitation in detection of non-cultivable forms of microorganisms, significant effect of preliminary empiric antibiotics therapy on results of the analysis. Methods of molecular diagnostics that are being actively developed and integrated during the last decade are deprived of these disadvantages. Main contemporary methods of molecular-biological diagnostics are examined in the review, actual data on their diagnostic characteristic are provided. Special attention is given to methods of PCR-diagnostics, including novel Russian developments. Methods of nucleic acid hybridization and proteomic analysis are examined in comparative aspect. Evaluation of application and perspectives of development of methods of molecular diagnostics of sepsis is given.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 91—99

Key words: sepsis, molecular methods, sepsis etiology, molecular diagnostics methods, PCR, real time PCR

Сепсис является актуальной проблемой современной медицины, важность которой определяется ростом количества больных, высокой летальностью и большими экономическими затратами на лечение. В среднем, летальность при сепсисе оценивается в 20 — 40%, а в случае развития инфекционно-токсического шока — в 80% [1]. В настоящее время сепсис определяется как патологический процесс, в основе которого лежит реакция организма в виде генерализованного (системного) воспаления на инфекцию различной природы (бактериальную, вирусную, грибковую) [3]. Обнаружение микроорганизмов в кровотоке у больных без клинико-лабораторных подтверждений синдрома системного воспаления может расцениваться как транзиторная бактериемия, которая может не быть обусловлена септическим процессом. А отсутствие бактериемии не должно исключить возможности диагноза «сепсис» при наличии существующих критериев сепсиса [3]. Тем не менее, выделение микроорганизма из крови (в норме стерильной жидкости) и его идентификация важны, так как этиологическая диагностика сепсиса является определяющей в выборе адекватных режимов антибактериальной терапии. «Золотым стандартом» расшифровки этиологии сепсиса остается бактериологический посев. Посев образца крови пациента позволяет выявить жизнеспособные формы микроорганизмов, которые находятся в активной стадии роста и являются наиболее вероятными возбудителями заболевания. Теоретическим пределом чувствительности метода считается 1 КОЕ бактерий или грибов на 10 мл образца крови [30]. В настоящее время доступно несколько полностью автоматизированных платформ для гемокультивирования, однако метод имеет существенные недостатки: не позволяет выявить некультивируемые микроорганизмы, для которых еще не разработаны методы лабораторного культивирования, а также вирусы; прием анти-микробных препаратов пациентом перед микробиологическим исследованием значительно снижает эффективность выявления микроорганизма из-за снижения количества жизнеспособных микробных клеток; время до получения результатов культивирования составляет, в среднем, 48 — 72 часа [25, 38]. Кроме того, для гемокультивирования требуется большой объем образца крови (до 20 — 30 мл) [24]. Получение такого количества клинического материала невозможно, например, для новорожденных, а использование меньших объемов образца значительно снижает аналитическую чувствительность микробиологической диагностики для данной группы пациентов.

Вышеуказанных недостатков лишены методы молекулярной диагностики, основанные на анализе белков или нуклеиновых кислот микроорганизмов. Ключевым преимуществом этих методов является возможность выявления некультивируемых форм возбудителей и одновременное выявление нескольких разных мишеней (как филогенетических маркеров патогенов, так и маркеров их антибиотикорезистентности) в одном клиническом образце, а также сокращение длительности анализа.

*Разнообразие методов молекулярной диагностики.* В настоящее время для клинического применения доступны тест-системы на основе трех различных методов молекулярно-биологического анализа: гибридизации нуклеиновых кислот, протеомного анализа с использованием масс-спектрометрии и ПЦР-амплификации фрагментов ДНК. Большинство ПЦР тест-систем реализовано в формате флуоресцентной детекции результата в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Различают мультиплексные тесты ПЦР-РВ, в которых идентификация происходит в процессе амплификации благодаря использованию нескольких систем праймеров и зондов, узкоспецифичных к различным мишеням, и тесты, в которых сначала проводится амплификация с широкоспецифичными праймерами, а затем полученные ПЦР-продукты идентифицируют путем гибридизации, масс-спектрометрического анализа или секвенирования и анализа полученных последовательностей ДНК.

Существуют две стратегии применения молекулярных методов в диагностике этиологии сепсиса — с предварительным гемокультивированием или напрямую, при непосредственном анализе образцов цельной крови. Гибридизационные и масс-спектрометрические тесты на сегодняшний день валидированы только для анализа гемокультур, а ПЦР-тесты реализованы как в формате анализа гемокультур, так и в формате прямого анализа клинических образцов.

*Гибридизационные методы.* Методы, основанные на *in situ* гибридизации генов филогенетических маркеров (или непосредственно рибосомальной РНК) возбудителей сепсиса с флуоресцентно меченными зондами (FISH), в настоящее время реализованы в тест-системах американских компаний AdvanDX (PNA FISH™ и QuickFISH™) и Gen-Probe

Inc. (AccuProbe, Bact). Эти методы показали высокую диагностическую чувствительность и специфичность (табл. 1). В нескольких работах были показаны оптимизация антибиотикотерапии и сокращение курса лечения по результатам применения теста PNA FISH™ [17].

Альтернативой *in situ* гибридизации является метод ДНК-ДНК гибридизации, реализованный в тест-системах серии Verigene компании Nanosphere, США. Эти полностью автоматизированные тест-системы подразумевают стадию выделения микробной ДНК из гемокультуры и двухступенчатую гибридизацию целевых фрагментов ДНК с зондами, иммобилизованными на микроматрице и наночастицах золота. Результат гибридизации детектируют физико-химическими методами [39]. В настоящее время в США и ЕС коммерчески доступны тест-системы для выявления грамположительных (BC-GP) и грамотрицательных (BC-GN) бактерий, а также нескольких генов их антибиотикорезистентности (табл. 1).

В целом, гибридизационные тесты позволяют существенно ускорить процесс идентификации возбудителей сепсиса в гемокультурах и одновременно выявить маркеры антибиотикорезистентности. Однако результаты такого анализа зависят от стадии культивирования, так как низкая эффективность гибридизации нуклеиновых кислот не позволяет достичь достаточной чувствительности метода для прямого анализа клинических образцов. Кроме того, на результат FISH-анализа влияет проницаемость клеточной стенки микроорганизмов для флуоресцентных зондов [18, 29].

*Методы протеомного анализа.* Протеомный анализ в настоящее время успешно применяется для идентификации микроорганизмов в жидких гемокультурах или колониях, полученных на твердых средах. Анализ выполняется методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF) и позволяет детектировать белки, специфичные для тех или иных микроорганизмов (в том числе, маркеры антибиотикорезистентности), и идентифицировать их по соответствующим базам данных. Опыт применения тест-систем BioType™ компании BrukerDaltonics (Германия), Vitek MS IVD (BioMerieux, Франция), Axima@SARAMIS™ (Shimadzu), MALDI micro MX™ (Waters Corporation) для идентификации возбудителей сепсиса в гемокультурах бактерий и грибов показывает, что диагностическая чувствительность метода находится в диапазоне 76 — 98%, а специфичность превышает 96% [28]. В клинических исследованиях было показано сокращение времени пребывания в стационаре за счет оптимизации антибиотикотерапии у 11,3 — 13,4% взрослых пациентов и 2,5% детей с сепсисом по результатам MALDI-TOF диагностики [13, 42]. Преимуществами масс-спектрометрической диагностики является сокращение времени анализа, мини-

Т а б л и ц а 1. Гибридизационные тест-системы

Название теста	Принцип анализа	Число выявляемых мишеней	Диагностическая чувствительность <sup>1</sup>	Диагностическая специфичность <sup>1</sup>
PNA FISH	FISH с пептидно-нуклеиновыми (ПНК) зондами	10 видов	94—99	99—100
QuickFISH	FISH рПНК с ПНК-зондами	7 видов бактерий в 3 тестах	98,8—99,5	89,5
AccuProbe (Bact)	FISH в модификации (технология НРА)	Отдельные тесты: стрептококки группы В, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>	80,8—100	98,7—100
Verigene BC-GP	ДНК-ДНК гибридизация с иммобилизованными зондами	9 видо- и 4 родоспецифичных мишени, гены антибиотикорезистентности <i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i>	80—100	99,5—100
Verigene BC-GN		4 видо- и 4 родоспецифичных мишени, 6 генов бета-лактамаз	86—100 <sup>2</sup>	100 <sup>2</sup>

П р и м е ч а н и е. <sup>1</sup>По сводным данным обзора Liesenfeld O. et al. [28]; <sup>2</sup>по данным производителя для FDA (управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов).

мальные трудозатраты на один анализ и возможность выявления широкого спектра микроорганизмов [28]. Существенными недостатками метода являются высокая стоимость оборудования, зависимость от стадии культивирования (невозможность работы непосредственно с клиническими образцами) и невозможность выявления нескольких возбудителей в одном образце вследствие ограниченной чувствительности (величины динамического диапазона) масс-спектрометров [14].

*Методы ПЦР-анализа.* В настоящее время амплификация ДНК с помощью ПЦР является единственным вариантом анализа, адаптированным для прямого анализа образцов крови. Наравне с методами прямой ПЦР-диагностики продолжают развиваться и активно использоваться методы ПЦР-анализа первичных гемокультур, инкубируемых менее 24 часов. В связи с широким распространением антибиотикорезистентных штаммов возбудителей большое значение приобретают своевременное выявление таких микроорганизмов, а значит, и наборы, позволяющие выявлять маркеры антибиотикорезистентности. Ниже подробно рассмотрены ПЦР-тесты, валидированные для клинического применения. Большинство из них коммерчески доступны и разрешены для клинического применения только в странах ЕС.

Тест-системы Prove-it sepsis (Mobidiag, Финляндия) и FilmArray (BioFire Diagnostics, США) полностью автоматизированы, начиная со стадии экстракции ДНК. Тест-система Prove-it основана на амплификации участков генов бактериальных топоизомераз *gyrB* и *parE* [20]. Текущая версия тест-системы позволяет детектировать 60 фило типов бактерий и 7 видов грибов рода *Candida*, а также гены резистентности бактерий к ванкомицину (*vanA/B*) и метициллину (*mecA*). Диагностическая чувствительность и специфичность тест-системы Prove-it, определенные по результатам анализа гемокультур, полученных от 2107 пациентов, в двухцентровом исследовании составили 95 и 99% соответственно. Причем, точность детекции метициллин-резистентных стафилококков оказалась близкой к 100% [7, 40]. Тест-система FilmArray позволяет детектировать порядка 25 таксономических групп патогенов (включая несколько видов грибов рода *Candida*) и 4 гена резистентности (к метициллину, ванкомицину и карбапенемам), панель может быть расширена для одновременной детекции порядка 100 мишеней [34]. Валидация тест-системы была проведена в ретроспективном и проспективном исследованиях с использованием около 200 гемокультур, полученных от взрослых и детей с бактериемией. Чувствительность и специфичность метода для различных бактериальных патогенов варьировали в диапазоне 83 — 100%. Важным недостатком тест-системы, как и в случае Prove-it, оказалась невозможность выявления возбудителей сепсиса в смешанных культурах [8].

ПЦР-анализ гемокультур в формате мультиплексных тестов реализован в панели тест-систем Huplex (Amplex Diagnostics, Германия), а также в тестах Xpert MRSA/SA BC (Cepheid, США), StaphPlex (Qiagen, США) и StaphSR assay (BD GeneOhm, США). Тест-системы Huplex основаны на использовании праймеров, выявляющих основные маркеры антибиотикорезистентности и гены токсинов бактерий, являющихся возбудителями нозокомиальных инфекций. Идентификация ПЦР-продуктов происходит путем их гибридизации с высокоспецифичными зондами и последующей иммуноферментной детекции гибридной ДНК. Время анализа гемокультур по схеме Huplex составляет 3 — 4 часа. В настоящее время коммерчески доступны 8 тестов Huplex для этиологической диагностики нозокомиальных инфекций, включая инфекции, вызываемые полирезистентными штаммами возбудителей. Чувствительность и специфичность метода существенно варьируют в различных тестах от 92,5 до 100% [43]. Одно из последних клинических исследований тест-системы Huplex MRSA plus для идентификации метициллин-резистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA) выявило 100% чувствительность и специфичность при нормировании на результаты микробиологической диагностики [7].

Тест-система Xpert MRSA/SA BC представляет собой полностью автоматизированное закрытое решение на аппаратной базе GeneXpert, предназначенное для дифференцированной диагностики MRSA и метициллин-чувствительного *Staphylococcus aureus* (MSSA) в гемокультурах. Время анализа составляет не более 1 часа, включая стадию автоматизированной экстракции ДНК. Чувствительность и специфичность теста составляют соответственно 100 и 98,6% для MSSA и 98,3 и 99,4% для MRSA [28]. В недавнем исследовании показано снижение стоимости антибиотикотерапии септических пациентов при ее оптимизации по результатам тестов Xpert MRSA/SA [6].

Тест-система StaphPlex позволяет амплифицировать и детектировать 18 различных

Таблица 2. Тест-системы прямой ПЦР-диагностики этиологии сепсиса в клинических образцах, коммерчески доступные в ЕС

Тест (производитель)	Патогены (заявленные)	Идентификация результатов	Выборка	Диагностическая чувствительность/ специфичность (референс)
SepsiTest (Molzym)	Более 450 видов бактерий и 24 вида грибов	Секвенирование ампликонов и анализ последовательностей алгоритмами NCBI BLAST, SepsiTest BLAST (Molzym) или RipSeq (Isentio)	Около 600 пациентов с подозрением на сепсис (по 3 исследованиям) [19, 23, 29, 31, 37, 38]	87/86 (для гемокультур)
VYOO (Analytik Jena)	34 вида бактерий, 7 видов грибов	Микроматричный анализ смеси ампликонов (microarray)	245 пациентов с подозрением на сепсис (по 1 исследованию) [9]	60/75 (для гемокультур)
LightCycler SeptiFast (Roche)	14 групп патогенных бактерий и 6 видов грибов родов <i>Aspergillus</i> и <i>Candida</i> [26]	Анализ кривых плавления ампликонов, идентификация по базе данных точек плавления с помощью ПО SeptiFast Identification Software	Около 7500 пациентов с сепсисом различной этиологии и сопутствующими инфекциями (по 41 исследованию) [5, 10, 12, 21, 23, 26, 27, 28, 32, 41]	Среднее по 34 исследованиям: 80/95 для бактериемии, 61/99 для фунгемии (клинически подтвержденный диагноз)
MagicPlex Sepsis Test (Seegene)	Детекция: 73 вида грам-, 16 видов грам+ бактерий и 6 видов грибов. Идентификация: 12 видов грам-, 9 видов грам+ бактерий, 6 видов грибов	Гибридизация ампликонов с высоко-специфичными зондами	267 взрослых пациентов с сепсисом различной этиологии (по 1 исследованию) [11]	65/92 (клинически подтвержденный диагноз)
FTD Neonatal sepsis (Fast-track diagnostics)	3 реакционных смеси: 1. стрептококки группы В и <i>Listeria monocytogenes</i> ; 2. <i>Escherichia coli</i> ; 3. цитомегаловирус, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> / <i>U. parvum</i>	Анализ сигналов ПЦР-РВ, полученных с различными праймерами	Результаты клинических исследований в настоящее время недоступны	Результаты клинических исследований в настоящее время недоступны, но тест валидирован для использования в клинической диагностике [16]

генетических маркеров стафилококков, включая гены антибиотикорезистентности и видовые маркеры *S. aureus*, в рамках одной реакционной смеси — в формате так называемого «супер-мультиплекса». Система валидирована для анализа гемокультур. Время анализа гемокультуры до получения результата составляет 5 часов, для данного теста отмечена 100% чувствительность и специфичность в диапазоне 95,5 — 100% [28].

Тест-система StaphSR assay предназначена для дифференцированной детекции MRSA/MSSA с помощью ПЦР-РВ на базе амплификатора SmartCycler (Cepheid), время анализа составляет 2,5 часа. В первом клиническом исследовании были показаны высокие диагностические характеристики метода (чувствительность 98,9% и специфичность 100%), однако расширение выборки образцов выявило ограничения области применения данной тест-системы [28].

Методы прямого выявления возбудителей в клинических образцах развиваются наиболее интенсивно, что связано с необходимостью минимизации времени анализа, особенно в случаях тяжелого сепсиса и сепсиса новорожденных. На момент подготовки обзора коммерчески доступными были пять тест-систем для прямой диагностики сепсиса на основе ПЦР-РВ. В табл. 2 представлены основные характеристики этих тестов. Очень высокая стоимость зарубежных наборов делает их недоступными для широкого применения в российских лабораториях и повышает актуальность современных российских разработок.

В Российской Федерации на сегодняшний день для выявления генетических маркеров антибиотикорезистентности микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией используются 3 отечественные тест-системы: для выявления метициллинрезистентности стафилококков «АмплиСенс®MRSA-FL», для выявления генов карбапенемаз групп KPC и OXA-48, характерных для энтеро-бактерий, «АмплиСенс®MDR KPC/OXA-48-FL» и для выявления генов металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM «АмплиСенс®MDR MBL-FL». Преимуществом данных наборов является возможность анализировать различные образцы — чистые культуры, гемокультуры, посев ликвора на среду обогащения, а также исходный биологический материал (например, мочу при острых инфекциях мочевыводящих путей или мазки со слизистых оболочек ротоглотки), что делает их незаменимым инструментом при проведении скрининга или эпидемиологических исследований. В клиническом исследовании образцов, полученных от пациентов с инфекцией в области хирургической раны после кардиохирургического вмешательства, чувствительность и специфичность тест-системы «АмплиСенс®MRSA-FL» составила 98,6 и 95,8% соответственно. В случае выделения MRSA и MSSA совпадение с микробиологическими методами отмечено в 100% [2]. Тесты для выявления генетических маркеров антибиотикорезистентности «АмплиСенс®MRSA-FL», «АмплиСенс®MDR KPC/OXA-48-FL» и «АмплиСенс®MDR MBL-FL» зарегистрированы и прошли клинические испытания на территории Российской Федерации, что позволяет уже сейчас использовать их в лабораторной практике.

*Перспективные разработки в области молекулярной диагностики для детекции возбудителей сепсиса.* С учетом необходимости адаптации методов молекулярной диагностики к рутинному использованию в клинических лабораториях в качестве перспективных разработок для этиологической диагностики сепсиса следует отметить следующие полностью автоматизированные решения на базе ПЦР-РВ: VAPChip компании Eppendorf Array Technologies (Бельгия), T2Bacteria и T2Candida компании T2Biosystems (США), PLEX-ID компании Abbott Molecular (США). Все эти тест-системы разработаны для прямого анализа клинических образцов крови, но в настоящее время доступны только для исследовательских целей.

В качестве перспективной методики рассматривается сэнгеровское секвенирование смеси ПЦР-продуктов с последующим математическим анализом смешанных хроматограмм, который позволяет идентифицировать последовательности, принадлежащие различным микроорганизмам без физического разделения ампликонов. Такой анализ реализован в форме Интернет-сервиса Ripseq норвежской компанией Isentio [22], продемонстрировано его успешное применение в диагностике сепсиса в комплексе с тест-системой SepsisTest [19]. Альтернативный алгоритм анализа хроматограмм предложен группой из ЦНИИЭ [15].

Помимо указанных пост-амплификационных тестов к перспективным разработкам в области молекулярной диагностики сепсиса можно отнести так называемые супер-мультиплексные тест-системы на базе асимметричной ПЦР-РВ, позволяющие детектировать 17 видов возбудителей сепсиса в одной реакционной смеси с молекулярными маячками (molecular beacons) в качестве зондов [36]. К настоящему времени эти тест-системы еще не прошли клинические испытания.

Возможности использования технологии Illumina Miseq были продемонстрированы при расследовании двух вспышек нозокомиальных инфекций, вызванных ванкомицин-резистентным штаммом *Enterococcus faecium* и карбапенем-резистентным штаммом *Enterobacter cloacae*. Применение полногеномного секвенирования позволило за короткое время (сутки) типировать антибиотикорезистентные штаммы и штаммы, не связанные с расследуемыми вспышками и являющиеся контаминантами ранее полученных гемокультур. Анализ геномных данных позволил также выявить основные механизмы антибиотикорезистентности возбудителей. При этом результаты молекулярной и микробиологической диагностики совпадали. Таким образом, была наглядно продемонстрирована высокая диагностическая достоверность молекулярной диагностики с применением полногеномного секвенирования [35].

В настоящее время в стадии клинической апробации находится разработанная в ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора панель мультиплексных ПЦР-РВ тестов для диагностики этиологии сепсиса, позволяющая идентифицировать и определять содержание ДНК грамотрицательных бактерий (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas*

aeruginosa, Enterobacteriaceae spp.), грамположительных бактерий (*Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp.), грибов рода *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*/*C. parapsilosis*). Кроме того, панель включает тест на выявление метициллинрезистентных стафилококков [4] и мультиплексные ПЦР-тесты для выявления генов карбапенемаз (охватывают все основные группы карбапенемаз, имеющие распространение в России, Европе и/или глобальное распространение). Тесты позволяют получить информацию о возможных возбудителях и антибиотикорезистентности патогенов уже через 1,5 — 3 часа. Возможен анализ различных образцов: чистых культур, гемокультур и непосредственно образцов крови.

Ключевыми преимуществами всех современных методов молекулярной диагностики возбудителей сепсиса являются значительное сокращение времени анализа по сравнению с традиционными микробиологическими методами, возможность детекции некультивируемых и медленно растущих микроорганизмов, возможность детекции патогенов после начала антибиотикотерапии. Помимо этого, молекулярные методы и, особенно ПЦР-анализ, имеют широкие возможности мультиплексирования, т.е. одновременной детекции и идентификации многих мишеней, включая факторы антибиотикорезистентности бактерий, что особенно актуально в свете стремительно возрастающей доли устойчивых штаммов в этиологической структуре сепсиса в последние годы [33]. В свою очередь, сокращение времени диагностики за счет использования молекулярных методов существенно уменьшает длительность эмпирической терапии и увеличивает эффективность лечения, что, в конечном счете, приводит к снижению общих затрат на лечение [28]. Однако до сих пор ни один из клинически валидированных молекулярных методов не является «золотым стандартом» детекции возбудителей сепсиса, полностью альтернативным гемокультуривированию. Причинами этого являются сложность обучения персонала, высокая стоимость оборудования, влияние контаминирующей ДНК на результаты теста и, как следствие, повышенные требования к чистоте реактивов, расходных материалов и рабочих помещений. Кроме того, результаты ПЦР-тестов существенно зависят от стадии пробоподготовки. Оптимальный метод экстракции НК должен быть достаточно селективным для получения препарата ДНК бактерий и грибов без ингибирующих концентраций ДНК человека и ингибиторов ПЦР, при этом потери микробных НК должны быть минимальны.

Несмотря на ряд проблем, ограничивающих широкое применение методов молекулярной диагностики, предоставляемые ими преимущества значительного ускорения времени анализа и расширения спектра детектируемых мишеней стимулируют создание нового «золотого стандарта» диагностики возбудителей сепсиса на молекулярно-биологической основе. Развитие этих методов ведется по направлению снижения удельной стоимости анализа за счет создания полностью автоматизированных решений с большой производительностью и минимальным временем работы оператора, таких как ПЦР-тесты Verigene, Prove-it, Film Array, VAPChip, серии GeneXpert и T2Biosystems. Однако этот вариант тест-систем создает проблему зависимости от одного типа оборудования, предоставляемого производителем теста. Альтернативным решением является разработка мультиплексных тестов, позволяющих выявлять широкий спектр мишеней без привязки к одному типу оборудования.

Решение проблемы низкой чувствительности, отмеченной для ряда ПЦР-тестов при прямом анализе цельной крови, непосредственно связано с повышением селективности и полноты экстракции микробной ДНК. Методики молекулярного анализа гемокультур не подразумевают повышенных требований к процедуре пробоподготовки. Кроме того, предварительное гемокультуривирование позволяет накопить клетки потенциального возбудителя и, тем самым, повысить вероятность его детекции, а значит, и чувствительность диагностики в целом. Однако при такой стратегии анализа сохраняется зависимость от культуральных методов, не позволяющая выявлять некультивируемые или медленно растущие микроорганизмы. Альтернативным решением по повышению чувствительности ПЦР-диагностики является применение больших объемов биологического материала, хотя такая стратегия не применима для случаев неонатального сепсиса.

Очевидна значительная востребованность молекулярных методов этиологической диагностики сепсиса, что делает перспективными активные работы по разработке новых тестов, совершенствованию уже имеющихся и регистрации таких технологий в Российской Федерации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Грувер К.П., Белобородов В.Б., Кузьменко Т.Н. Актуальные аспекты сепсиса. Антибиотики и химиотерапия. 2011, 56 (3-4): 35-40.
2. Ильина В.Н., Субботовская А.И., Князькова Л.Г., Козырева В.С., Скачкова Т.С., Шипулина О.Ю., Сергеевичев Д.С., Субботовский А.П. Применение молекулярно-биологических методов исследования для диагностики инфекции области хирургического вмешательства, вызванной бактериями рода *Staphylococcus*. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2011, 4: 43-46.
3. Савельев В.С., Гельфанд Б.Р. (ред.) Сепсис в начале XXI века. Классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение. Патолого-анатомическая диагностика. Практическое руководство. М, 2006.
4. Скачкова Т.С., Шипулина О.Ю., Домонова Э.А. и др. Разработка и апробация набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК метициллинчувствительного и метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus*, а также метициллинрезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени». Клиническая лабораторная диагностика. 2013, 6: 42-45.
5. Avolio M., Diamante P., Modolo M.L. et al. Direct molecular detection of pathogens in blood as specific rule-in diagnostic biomarker in patients with presumed sepsis: our experience on a heterogeneous cohort of patients with signs of infective systemic inflammatory response syndrome. *Shock*. 2014, 42 (2): 86-92.
6. Bauer K.A., West J.E., Balada-Llasat J.-M. et al. An antimicrobial stewardship program's impact with rapid polymerase chain reaction methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/S. aureus blood culture test in patients with S. aureus bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 2010, 5: 1074-1080.
7. Becker K., Larsen A.R., Skov R.L. et al. Evaluation of a modular multiplex-PCR methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection assay adapted for *mecC* detection. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51 (6): 1917-1919.
8. Blaschke A.J., Heyrend C., Byington C.L. et al. Rapid identification of pathogens from positive blood cultures by multiplex polymerase chain reaction using the Film Array system. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012, 74 (4): 349-355.
9. Bloos F., Sachse S., Kortgen A. et al. Evaluation of a polymerase chain reaction assay for pathogen detection in septic patients under routine condition: an observational study. *PLoS One*. 2012, 7 (9): e46003.
10. Burdino E., Ruggiero T., Aliche T. et al. Combination of conventional blood cultures and the SeptiFast molecular test in patients with suspected sepsis for the identification of bloodstream pathogens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014, 79 (3): 287-292.
11. Carrara L., Navarro F., Turbau M. et al. Molecular diagnosis of bloodstream infections with a new dual priming oligonucleotide-based multiplex PCR assay. *J. Med. Microbiol.* 2013, 62: 1673-1679.
12. Chang S.-S., Hsieh W.-H., Liu T.-S. et al. Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis — a systemic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013, 8 (5): e62323.
13. Clerc O., Prod'hom G., Vogne C. et al. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin. Infect. Dis.* 2013, 56: 1101-1107.
14. Drancourt M. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010, 16: 1620-1625.
15. Fantin Y.S., Neverov A.D., Favorov A.V. et al. Base-Calling Algorithm with Vocabulary (BCV) method for analyzing population sequencing chromatograms. *PLoS One*. 2013, 8 (1): e54835.
16. Fast-track diagnostics. FTD neonatal sepsis. Manual. 2012, V1.
17. Forrest G.N. PNA FISH: present and future impact on patient management. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2007, 7: 231-236.
18. Gescher D.M., Kovacevic D., Schmiedel D. et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 2008, 32 (S1): S51-S59.
19. Haag H., Locher F., Nolte O. Molecular diagnosis of microbial aetiologies using SepsiT<sup>TM</sup> in the daily routine of a diagnostic laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013, 76 (4): 413-418.
20. Jarvinen A.K., Laakso S., Piiparinen P. et al. Rapid identification of bacterial pathogens using a PCR- and microarray-based assay. *BMC Microbiol.* 2009, 9: 161.

21. Kasper D.C., Altiok I., Mechtler T.P. et al. Molecular detection of late-onset neonatal sepsis in premature infants using small blood volumes: proof-of-concept. *Neonatology*. 2013, 103 (4): 268-273.
22. Kommedal O., Karlsen B., Saebo O. Analysis of mixed sequencing chromatograms and its application in direct 16s rRNA gene sequencing of polymicrobial samples. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46: 3766-3771.
23. Lebovitz E.E., Burbelo P.D. Commercial multiplex technologies for the microbiological diagnosis of sepsis. *Mol. Diagn. Ther.* 2013, 17 (4): 221-231.
24. Lee A., Mirrett S., Reller L.B., Weinstein M.P. Detection of bloodstream infections in adults: how many blood cultures are needed? *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45: 3546-3548.
25. Leggieri N., Rida A., François P., Schrenzel J. Molecular diagnosis of bloodstream infections: planning to (physically) reach the bedside. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2010, 23: 311-319.
26. Lehmann L.E., Alvarez J., Hunfeld K.-P. et al. Potential clinical utility of polymerase chain reaction in microbiological testing for sepsis. *Crit. Care Med.* 2009, 37 (12): 3085-3090.
27. Lehmann L.E., Herpichboehm B., Kost G.J. et al. Cost and mortality prediction using polymerase chain reaction pathogen detection in sepsis: evidence from three observational trials. *Crit. Care*. 2010, 14: R186.
28. Liesenfeld O., Lehman L., Hunfeld K.-P. et al. Molecular diagnosis of sepsis: new aspects and recent developments. *Europ. J. Microbiol. Immunol.* 2014, 4 (1): 1-25.
29. Lindholm L., Sarkkinen H. Direct identification of gram-positive cocci from routine blood cultures by using AccuProbe tests. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42: 5609-5613.
30. Mancini N., Carletti S., Ghidoli N. et al. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010, 23: 235-251.
31. Mencacci A., Leli C., Montagna P. et al. Diagnosis of infective endocarditis: comparison of the LightCycler SeptiFast real-time PCR with blood culture. *J. Med. Microbiol.* 2012, 61 (6): 881-883.
32. Paolucci M., Capretti M.G., Dal Monte P. et al. Laboratory diagnosis of late-onset sepsis in newborns by multiplex real-time PCR. *J. Med. Microbiol.* 2009, 58: 533-534.
33. Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2013, 11 (3): 297-308.
34. Poritz M.A., Blaschke A.J., Byington C.L. et al. FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection: development and application to respiratory tract infection. *PLoS One*. 2011, 6: e26047.
35. Reuter S., Ellington M.J., Cartwright E.J. et al. Rapid bacterial whole-genome sequencing to enhance diagnostic and public health microbiology. *JAMA Intern. Med.* 2013, 173 (15): 1397-1404.
36. Rice L.M., Reis A.H.Jr., Ronish B. et al. Design of a single-tube, endpoint, linear-after-the-exponential-PCR assay for 17 pathogens associated with sepsis. *J. Appl. Microbiol.* 2013, 114: 457-469.
37. Schreiber J., Nierhaus A., Braune S.A. et al. Comparison of three different commercial PCR assays for the detection of pathogens in critically ill sepsis patients. *Med. Klin. Intensivmed. Notfmed.* 2013, 108 (4): 311-318.
38. Shah S.S., Downes K.J., Elliott M.R. et al. How long does it take to «rule out» bacteremia in children with central venous catheters? *Pediatrics*. 2008, 121: 135-141.
39. Storhoff J.J., Lucas A.D., Garimella V. et al. Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. *Nat. Biotechnol.* 2004, 22 (7): 883-887.
40. Tissari P., Zumla A., Tarkka E. et al. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *Lancet*. 2010, 375 (9710): 224-230.
41. Torres-Martos E., Perez-Ruiz M., Pedrosa-Corral I. et al. Evaluación de la técnica LightCycler® SeptiFast en recién nacidos y lactantes con sospecha de sepsis. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 2013, 31 (6): 375-379.
42. Vlek A.L.M., Bonten M.J.M., Boel C.H.E. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One*. 2012, 7 (3): e32589.
43. Wellinghausen N., Wirths B., Essig A. et al. Evaluation of the hyplex bloodscreen multiplex PCR-enzyme-linked immunosorbent assay system for direct identification of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42: 3147-3152.

*Поступила 27.05.15*

Контактная информация: Скачкова Татьяна Сергеевна,  
111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а, р.т. (495) 672-11-58

## **РОЛЬ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ПАТОГЕНЕЗЕ ПАРОДОНТИТА**

<sup>1</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, <sup>2</sup>НИИ вакцин и сывороток им.И.И. Мечникова, Москва

Хронический генерализованный пародонтит (ХГП) — индуцированное бактериями заболевание тканей пародонта, поддерживающих зуб, которое характеризуется наличием процессов воспаления с разрушением костной ткани. Знание молекулярных механизмов патогенеза ХГП способствует созданию наиболее эффективных методов лечения данного заболевания. Бактериальная инфекция является первичным фактором в этиологии пародонтита, но не достаточным для его начала и последующего развития. Известно, что бактериальные факторы индуцируют местную воспалительную реакцию и активируют систему врожденного иммунитета через активацию Toll-подобных рецепторов (TLR), расположенных на поверхности резидентных клеток и лейкоцитов. Активация этих клеток приводит к выработке провоспалительных цитокинов и привлечению в зону воспаления фагоцитов и лимфоцитов. В обзоре мы рассматриваем известные данные о факторах иммунной защиты пародонта включая клеточные популяции и цитокины, а также механизмы разрушения тканей, поддерживающих зуб. Также обсуждаются перспективы лечения.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 100—107

Ключевые слова: врожденный иммунитет, пародонтит, TLR, цитокины

*L.V.Gankovskaya<sup>1</sup>, N.M.Khelminskaya<sup>1</sup>, E.A.Molchanova<sup>1</sup>, O.A.Svitich<sup>2</sup>*

## **ROLE OF INNATE IMMUNITY FACTORS IN PERIODONTITIS PATHOGENESIS**

<sup>1</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, <sup>2</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Chronic generalized periodontitis (CGP) is a disease of periodontium tissues supporting tooth induced by bacteria, that is characterized by the presence of processes of inflammation with destruction of bone tissue. The knowledge of molecular mechanisms of CGP pathogenesis facilitates creation of the most effective methods of therapy of this disease. Bacterial infection is a primary factor in periodontitis etiology, however is not sufficient for its start and subsequent development. It is known, that bacterial factors induce a local inflammation reaction and activate the system of innate immunity through activation of Toll-like receptors (TLR), located on the surface of resident cells and leukocytes. Activation of these cells results in production of pro-inflammatory cytokines and recruitment of phagocytes and lymphocytes into the inflammation zone. In review we examined the known data regarding factors of immune protection of periodontium including cell populations and cytokines, as well as mechanisms of tissue destruction, that support the tooth. Perspectives of therapy are also discussed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 100—107

Key words: innate immunity, periodontitis, TLR, cytokines

Пародонтит — воспалительное заболевание тканей, окружающих зуб, относится к числу болезней, известных с древнейших времен. Согласно имеющимся оценкам около 75% взрослого населения развитых стран страдают пародонтитом в той или иной форме. Уровень заболеваемости в развивающихся странах еще выше, хотя и не поддается точному статистическому учету. Этому заболеванию также в значительной степени подвержены