

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ ОБЪЕКТОВ ВНУТРИБОЛЬНИЧНОЙ СРЕДЫ

<sup>1</sup>Национальный медико-хирургический центр им. Н.И.Пирогова, <sup>2</sup>Национальный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф.Гамалеи, <sup>3</sup>Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

*Цель.* Провести сравнительный анализ эффективности использования бактериологических и молекулярно-биологических методов исследования с целью оценки микробной обсемененности объектов внутрибольничной среды как факторов передачи микроорганизмов. *Материалы и методы.* Проведено комплексное лабораторное обследование объектов внутрибольничной среды хирургических, реанимационных, гематологических отделений крупной многопрофильной клиники в течение 2017 г., в ходе которого отобрано 215 проб. *Результаты.* Микробная обсемененность объектов внутрибольничной среды составила 54,0% при проведении бактериологического исследования и 80,0% — при проведении молекулярно-биологического исследования. Между частотой бактериологического выделения микроорганизмов и определением ДНК возбудителей в различных отделениях стационара выявлена сильная прямая корреляционная связь ( $r=0,92$ ). Совпадение результатов при двух методах исследования в большинстве случаев отмечено при высоких значениях числа копий ДНК (800-10000). При молекулярно-биологическом методе диагностики в 1,9 раза чаще выявлялся ген резистентности (*mec A*) у золотистого стафилококка и в 19,4±7,2% смывов обнаружены гены металло-бета-лактамаз (MBL) у основных грамотрицательных возбудителей. *Заключение.* Использование молекулярно-биологических методов диагностики позволяет значительно чаще обнаруживать микроорганизмы на объектах внутрибольничной среды.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 73—78

Ключевые слова: инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи; бактериологические и молекулярно-биологические методы диагностики, микроорганизмы, объекты внутрибольничной среды

О.А.Orlova<sup>1, 2, 3</sup>, Т.А.Semenenko<sup>2</sup>, V.G.Akimkin<sup>3</sup>

## COMPARATIVE ANALYSIS OF EFFICIENCY OF BACTERIOLOGICAL AND MOLECULAR-BIOLOGICAL METHODS FOR THE ASSESSMENT OF MICROBIAL CONTAMINATION OF HOSPITAL ENVIRONMENT OBJECTS

<sup>1</sup>Pirogov National Medical and Surgical Center, <sup>2</sup>Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, <sup>3</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

*Aim.* To conduct a comparative analysis of bacteriological and molecular biological research methods to assess the microbial contamination of objects of hospital environment as factors of microbial transmission. *Materials and methods.* A comprehensive laboratory investigation of nosocomial environment of surgical, intensive care, hematology divisions of a large multi-disciplinary clinic during 2017 was carried out, while 215 samples were selected. *Results.* Microbial contamination of hospital environment facilities accounted for 54,0% when carrying out bacteriological tests and 80,0% — in conducting molecular biological studies. Between the frequency of bacteriological isolation of microorganisms and the determination of DNA of pathogens in different departments of the hospital, a strong direct correlation was revealed ( $r=0.92$ ). The coincidence of the results of the two methods of research in most cases was observed at high values of the number of DNA copies (800-10000). The molecular biological method of diagnosis revealed the Methicillin-resistant Staphylococcus 1.9 times more often and in 19,4±7,2% of swabs detected metal-beta-

lactamase (MBL) genes in major gram-negative pathogens. *Conclusion.* The use of molecular biological methods allows to detect microorganisms on the objects of hospital environment much more often than during bacteriological examination.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 73—78

Key words: health-care-associated infections, bacteriological and molecular biological diagnostic methods, microorganisms, environmental objects

## ВВЕДЕНИЕ

Стратегической задачей здравоохранения является обеспечение качества медицинской помощи и создание безопасной среды пребывания для пациентов и персонала в медицинских учреждениях [6]. Неотъемлемой составляющей мер по обеспечению безопасности и качества медицинской деятельности является оптимизация системы эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Актуальность ИСМП определяется их широким распространением, негативным воздействием на здоровье и жизнь пациентов, увеличением расходов на оказание медицинской помощи и др. [9].

Результаты научных исследований показали, что ИСМП поражают в Российской Федерации в среднем 10% госпитализированных пациентов, составляя ежегодно не менее 2,5 — 3 млн случаев [5]. Общий экономический ущерб, причиняемый ИСМП ежегодно, при этом может достигать 300 млрд рублей [1].

В каждой медицинской организации циркулируют те или иные микроорганизмы, которые представляют собой угрозу развития ИСМП у пациентов. Уровень колонизации ими больничных объектов при использовании бактериологических методов исследования составляет от 5% до 36% [4,7]. В то же время, проблема профилактики ИСМП требует качественного эпидемиологического анализа ситуаций с привлечением современных высокочувствительных методов, которые используются в диагностике традиционных инфекционных заболеваний, в том числе для выявления источников инфекции и факторов передачи возбудителя во время эпидемических вспышек.

В настоящее время методы молекулярной биологии, основанные на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР), находят все более широкое применение в целях диагностики и экспресс-анализа разнообразного биологического материала. Интенсивное развитие подобных методик обусловлено очень высокой чувствительностью ПЦР, возможностью быстрого получения результатов, низкой стоимостью получаемых результатов (по сравнению с другими методиками) и технологичностью. Их использование необходимо для решения таких серьезных проблем, как широкое распространение устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к лекарственным препаратам, что наиболее ярко проявляется в отношении возбудителей ИСМП [12]. В последние годы отмечается глобальный характер распространения детерминант резистентности к антимикробным препаратам, при этом значительную угрозу представляет возможность выноса за пределы стационаров и распространения в обществе устойчивых к антимикробным препаратам микроорганизмов или генетических структур, содержащих гены антибиотикорезистентности [11].

Эпидемиологические и медицинское значение заболеваний, вызываемых устойчивыми к антибиотикам патогенами, чрезвычайно велико, так, например, лишь с нечувствительными к цефалоспорином 3 поколения *K.pneumoniae*, *E.coli* и метициллинрезистентным *Staphylococcus aureus* (MRSA) в России связаны общие затраты на лечение пациентов в РФ в размере более 12 млрд руб. [2].

Генетической характеристикой всех MRSA, независимо от генотипов SCCmec элемента, является наличие гена *mecA*, обуславливающего устойчивость данных штаммов к оксацилину и бета-лактамам антибиотикам, и генов *сst*-комплекса, которые кодируют белки, осуществляющие эксцизию и сайт специфическую интеграцию *mecA* в геном стафилококков [13].

На основании результатов исследований, проведенных в последние годы, рекомендовано использование методов молекулярно-биологической диагностики при проведении микробиологического мониторинга, в т.ч. и состояния объектов внутрибольничной среды, что позволит быстро реагировать на эпидемические вспышки, обусловленные «госпитальными» штаммами, сформировавшимися в стационарах, и штаммами, заносимыми в стационары из других медицинских организаций [3,8,10].

Цель исследования — провести сравнительный анализ эффективности использования бактериологических и молекулярно-биологических методов для оценки микробной обсемененности объектов внутрибольничной среды как факторов передачи микроорганизмов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено комплексное лабораторное обследование объектов внутрибольничной среды хирургических, реанимационных, гематологических отделений крупной многопрофильной клиники в течение 2017 года. Отобрано 215 проб с наиболее значимых в эпидемиологическом плане объектов: рук и спецодежды медицинского персонала, телефонных аппаратов, клавиатуры компьютера, кнопок перфузора, ручек дозаторов, мониторов аппаратов ИВЛ, манипуляционных столиков, дверных ручек, спинок кроватей пациентов, штативов для внутривенных инфузий, консолей.

Смывы с объектов внутрибольничной среды проводили с использованием традиционных питательных сред (мясо-пептонный бульон, среды Эндо, Вильсон-Блер, псевдомонадный агар, манитолагар, среда Сабуро). Для идентификации микроорганизмов бактериологическим методом использовали автоматический микробиологический анализатор «Vitek-2» (Лашенкова Н.Н., НМХЦ им. Н.И. Пирогова).

Выявление в образцах биоматериала ДНК основных бактериальных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и генетических детерминант их антибиотикорезистентности проводили методом мультиплексной ПЦР-РВ с использованием методик и наборов реагентов, разработанных в ЦНИИ эпидемиологии. Использованные методики и наборы реагентов основаны на ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с помощью флуоресцентно-меченных олигонуклеотидных зондов. ПЦР-исследование выполнялось с помощью систем для проведения ПЦР-РВ RotorGene Q и CFX96 Touch. Экстракцию ДНК из образцов биоматериала (смывы с объектов внутрибольничной среды) проводили с использованием комплектов реагентов «РИБО-преп».

Для выявления ДНК *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и *Enterococcus* spp. использовали методику, включающую два мультиплексных ПЦР-РВ-теста, позволяющие детектировать специфические фрагменты ДНК возбудителей инфекций каждого из выявляемых видов или групп бактерий по отдельному каналу флуоресцентной детекции. Для выявления генов приобретенных карбапенемаз основных групп — металло-бета-лактамаз (MBL) групп VIM, NDM и IMP у основных грам-отрица-

тельных возбудителей инфекций использовали наборы реагентов «АмплиСенс® MDR-MBL-FL» и «АмплиСенс® MDR-KPC/OXA-48-FL». Для выявления ДНК метициллин-резистентных стафилококков (как MRSA, так и MRCNS) и идентификации ДНК *S. aureus* использовали набор реагентов «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» (Савочкина Ю.А., Скачкова Т.Н., ЦНИИ эпидемиологии).

Рассчитывали интенсивные показатели частоты выделения микроорганизмов, экстенсивные показатели распределения структуры выделенных микроорганизмов, коэффициент линейной корреляции между выделением микроорганизмов и ДНК микроорганизмов, достоверность различий показателей оценивали с использованием критерия Стьюдента (*t*). Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За период проведения исследования микробная обсемененность объектов внутрибольничной среды составила  $54,0 \pm 2,8\%$  на основании данных бактериологического изучения и  $80,0 \pm 3,4\%$  — по результатам использования молекулярно-биологических методов. Между частотой бактериологического выделения микроорганизмов и определением ДНК возбудителей в различных отделениях стационара выявлена сильная прямая корреляционная связь ( $r=0,92$ ).

С помощью бактериологического метода обнаружено 129 микроорганизмов, с преобладанием коагулазонегативных стафилококков (КНС) в 91 (70,5%) случае. Использование методов молекулярной диагностики позволило выявить 288 микроорганизмов с преимущественным выделением ДНК КНС в 160 (55,6%), *Streptococcus spp.* — в 57 (19,8%) и *Enterococcus spp.* — в 48 (16,7%) случаях.

Микроорганизмы на объектах внутрибольничной среды были обнаружены как в изолированном виде, так и в виде ассоциаций. Достоверно чаще сочетания различных микроорганизмов выявлялись с помощью молекулярно-биологического метода по сравнению с бактериологическим методом:  $30,9 \pm 2,8\%$  против  $13,5 \pm 1,2\%$  ( $p < 0,05$ ). В ассоциациях микроорганизмов доминирующими являлись следующие сочетания: КНС с *Enterococcus spp.* — в  $33,3 \pm 4,6\%$  и КНС с *Pseudomonas spp.* — в  $27,8 \pm 3,8\%$  случаев. Методом молекулярной диагностики чаще всего обнаруживали комбинации таких микроорганизмов как КНС и *Streptococcus spp.* —  $24,7 \pm 1,2\%$ , КНС и *Enterococcus spp.* —  $14,6 \pm 2,6\%$  и КНС, *Streptococcus spp.* и *Enterococcus spp.* —  $39,3 \pm 1,5\%$ .

Частота выделения эпидемиологически значимых микроорганизмов, относящихся к группе ESCAPE, составила  $22,7 \pm 4,3\%$  с использованием бактериологического метода и  $41,3 \pm 3,2\%$  — при молекулярно-биологическом тестировании ( $p < 0,05$ ). Наиболее часто выделялись *Enterococcus spp.* (6,0% и 16,7%), а также *Staphylococcus aureus* (2,6% и 3,1%), соответственно.

Достоверно чаще молекулярно-биологическим методом исследования обнаруживали ген *mec A* (устойчивости к метициллину) у *Staphylococcus spp.* —  $58,1 \pm 8,7\%$ , чем бактериологическим методом исследовании выявляли метициллинрезистентные стафилококки (MRS) —  $30,0 \pm 5,4\%$  ( $p < 0,05$ ).

Также молекулярно-биологическим методом исследования в  $19,4 \pm 7,2\%$  случаев были выявлены гены металло-β-лактамазы (VIM, NDM, IMP), тогда как бактериологическим методом металло-β-лактамазы выявлены не были ( $p < 0,05$ ).

Наиболее часто встречаемым микроорганизмом при использовании двух методов исследования являлся КНС, однако частота его выявления варьировала в зависимости от отделения. Совпадение результатов двух методов исследования установлено только в 65 случаях. В остальных пробах отмечено несовпадение результатов: положительные результаты бактериологических исследований и отрицательные мо-

лекулярно-биологических исследований определены в 26 случаях, а отрицательные результаты бактериологических исследований на фоне положительных молекулярно-биологических исследований — в 95 случаях.

Проведенное исследование не позволяет дать ответ на вопрос о жизнеспособности микроорганизмов, находящихся на объектах внутрибольничной среды, однако обнаружение ДНК возбудителей свидетельствует о том, что они в течение времени контаминировали поверхности и могли являться источником внутрибольничного заражения пациентов, что согласуется с результатами ранее опубликованных работ о возможности использования ПЦР в реальном времени как метода прогнозирования загрязнения внутрибольничной окружающей среды [14].

Таким образом, основным назначением молекулярно-биологических методов в эпидемиологии ИСМП в ближайшее время должно стать слежение за популяционной структурой возбудителей, а также определение колонизации объектов внутрибольничной среды, как факторов их передачи, с целью оценки, прогнозирования эпидемической ситуации и обоснования своевременного вмешательства в ход эпидемического процесса.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Акимкин В.Г., Семенов Т.А., Никитина Г.Ю., Годков М.А., Скворцов С.В. Эпидемиология гепатитов В и С в лечебно-профилактических учреждениях. М., ООО Издательский дом «Бионика», 2013.
2. Гомон Ю.М., Светличная Ю.С., Колбин А.С., Сидоренко С.В., Дарьина М.Г., Зуева Л.П., Курылев А.А., Иванов И.Г., Стрижелецкий В.В. Бремя резистентности бактериальных инфекций, вызванных резистентными штаммами *S.aureus*, *E.coli*, *K.pneumoniae* в России. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018, 4:310-317.
3. Гончаров А.Е. Молекулярно-генетический мониторинг за эпидемическими клонами *Staphylococcus aureus* и *Acinetobacter baumannii* в системе эпидемиологического надзора за внутрибольничными инфекциями. Дисс. д-ра. мед. наук, 2017.
4. Захарова Ю.А. Совершенствование эпидемиологического надзора за гнойно-септическими инфекциями в акушерских стационарах на основе оптимизации эпидемиологического и микробиологического мониторингов. Автореф. дисс. д-ра мед. наук. Пермь, 2009.
5. Найговзина Н.Б., Попова А.Ю., Бирюкова Е.Е., Ежлова Е.Б., Игонина Е.П., Покровский В.И., Акимкин В.Г., Тутельян А.В., Шестопалов Н.В., Краевой С.А., Костенко Н.А., Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Фельдблюм И.В., Шкарин В.В., Козлов Р.С., Стасенко В.Л., Голубкова А.А., Сухих Г.Т., Припутневич Т.В., Шамаков Р.Г., Зубков В.В., Шкода А.С., Шумилов В.И., Митрохин С.Д., Ершова О.Н., Селькова Е.П., Гренкова Т.А., Иванов И.В., Швабский О.Р. Оптимизация системы мер борьбы и профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в Российской Федерации. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2018, 1: 6-14.
6. Онищенко Г.Г. Национальная Концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 6 ноября 2011 г.). <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70000121/#ixzz31Obdk4MV>.
7. Орлова О.А., Акимкин В.Г. Микробиологический пейзаж отделения хирургической реанимации. Дезинфекционное дело. 2014, 4 (90): 53-58.
8. Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишена О.В. Внутрибольничные инфекции: новые горизонты профилактики. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2011, 1:4-7.
9. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Игонина Е.П., Мельникова А.А., Фролова Н.В. Надзор за соблюдением санитарно-эпидемиологического законодательства при оказании медицинской помощи в целях обеспечения ее качества и безопасности. Вестник Росздравнадзора. 2016, 1: 74-78.
10. Федеральные клинические рекомендации. Молекулярно-генетический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. 2015. [http://nasci.ru/\\_resources/directory/198/common/2014\\_8\\_Molec\\_monitoring\\_new.pdf](http://nasci.ru/_resources/directory/198/common/2014_8_Molec_monitoring_new.pdf).

11. Abdollahi S., Ramazanzadeh R., Khiabani Z.D. et al. Epidemiological and Inducible Resistance in Coagulase Negative Staphylococci. *Glob. J. Health Sci.* 2015, 8(4): 109-119.
12. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
13. Katayama J., Ito T., Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44: 1549-1555.
14. Livorsi D.J., Arif S., Garry P. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nasal real-time PCR: a predictive tool for contamination of the hospital environment. *Infection Control and Hospital Epidemiology.* 2015 Jan; 36(1): 34-39.

Поступила 07.06.19

Контактная информация: Орлова Оксана Анатольевна, д.м.н.,  
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (499)193-30-01

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Г.В.Кужлина, Г.Д.Елагин, Д.В.Печенкин, О.О.Фоменков, А.В.Еремкин, А.А.Кытманов, С.А.Шурупов, С.С.Ипатов*

### **ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОМ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К АНТИГЕНАМ BURKHOLDERIA MALLEI И BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI**

Филиал 48 Центрального НИИ Министерства обороны Российской Федерации, Киров

*Цель.* Получение гибридом, продуцирующих специфические моноклональные антитела к антигенам *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*. *Материалы и методы.* В работе использовали микробные культуры из Государственной коллекции микроорганизмов филиала 48 ЦНИИ Минобороны России (г. Киров); мыши линии BALB/c. Гибридизацию В-лимфоцитов и миеломных клеток SP2/0-Ag14 проводили по методике G.Kohler и С.Milstein в модификации De St.Fazekas и D.Scheidegger. Исследование специфической активности иммунных сывороток, супернатантов гибридом и асцитических жидкостей, а также оценку диагностических возможностей моноклональных антител проводили методом иммуноферментного анализа. *Результаты.* В результате проведенных гибридизаций получены и охарактеризованы гибридомы-продуценты моноклональных антител к специфическим антигенам возбудителей сапа и мелиоидоза. Полученные гибридомы являются активными и стабильными антителопродуцентами при многократном пассировании *in vitro* и *in vivo*. Получены асцитические жидкости, из которых выделены иммуноглобулины. Проведен выбор антител, обеспечивающих наибольшую чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа. *Заключение.* Моноклональные антитела, продуцируемые полученными гибридомами, планируется использовать для конструирования иммунобиологических препаратов.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 78—82

Ключевые слова: *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, гибридомы, моноклональные антитела