

На правах рукописи

МИРСАЯПОВА Ирина Анатольевна

**РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
КАЧЕСТВЕННОЙ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ДЕТЕКЦИИ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ**

03.02.03 – микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Уфа – 2012

Работа выполнена на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Мавзютов Айрат Радикович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Ефимов Георгий Емельянович,
доктор медицинских наук, профессор
Рудаков Николай Викторович

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «15» марта 2012 г. в 11-00 часов на заседании диссертационного совета ДМ 208.006.05 при ГБОУ ВПО БГМУ Минздравсоцразвития России (450000, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО БГМУ Минздравсоцразвития России по адресу 450000, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3.

Автореферат разослан «13» февраля 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

К.А. Лукманова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. К основным формам пневмоний относят внебольничную пневмонию (ВП), которую отличают преимущественно бактериальная этиология, распространенность среди населения всех возрастных групп, высокая смертность, особенно среди лиц пожилого возраста и новорожденных. (Зубков М.Н., 2005; Чучалин А.Г., 2011; Harris M. et al., 2011).

Типичными возбудителями для данного заболевания являются *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*, выявляемыми в 30–50% и 10% случаев заболевания соответственно (Бачинская Е.Н., 2000; Зубков М.Н., 2005; Чучалин А.Г., 2007). Несколько реже (3–5%) при ВП обнаруживают *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (Байгозина Е.А., 2009; Синопальников А.И., 2007; Сидорова Л.Д., 2005; Чучалин А.Г., 2006; Jones M.E., 2003), *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila pneumophila* (Вишнякова Л.А., 2005; Темежникова Н.Д., 2008; Чучалин А.Г., 2005; Arnold F.W., 2007; Fields B.S., 2002). Однако не исключается, что истинная частота встречаемости и видовой состав возбудителей ВП могут существенно отличаться от приведенных литературных данных, поскольку для лабораторного их выявления и идентификации используются методы, информативность которых в зависимости от вида бактерий, исследуемого материала, фазы заболевания и т. д. может варьировать в очень широких пределах.

Исходя из вышеизложенного текста, диагностический интерес при ВП могут представлять молекулярно-генетические методы, главным образом, различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Тартаковский И.С., 2002; Murdoch D.R., Yoshimoto A., 2005). Однако в настоящее время их более широкое применение сдерживается узким спектром соответствующих тест-систем (Тартаковский И.С., 2002; Harris M. et al., 2011; Strålin K., Korgaard J., 2006; Utine G.E., Pinar A., 2008), что и предопределило цель нашего исследования.

Цель исследования. Конструирование, испытание и сравнительная оценка информативности новых диагностических систем для ПЦР-детекции минорных возбудителей ВП в клиническом материале для повышения эффективности этиологической диагностики заболевания.

Задачи исследования:

1. Провести множественное выравнивание известных последовательностей ДНК возбудителей пневмоний, зарегистрированных в международных базах данных генов EMBL/GenBank/DDBJ, с целью поиска наиболее консервативных участков и подбора соответствующих олигонуклеотидных праймеров.

2. Провести испытания сконструированных тест-систем на основе разработанных праймеров на положительных и отрицательных контрольных образцах для оценки их чувствительности и специфичности.

3. Провести сравнительную оценку информативности сконструированных молекулярно-генетических тест-систем и рутинных методов (микроскопический, культуральный) при исследовании клинических образцов при различных клинических вариантах внебольничной пневмонии.

4. Разработать алгоритм этиологической диагностики ВП с использованием молекулярно-генетического метода.

Научная новизна. Подобраны и апробированы олигонуклеотидные праймеры к гену 16S рРНК следующих возбудителей внебольничной пневмонии: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*. На их основе впервые сконструированы тест-системы для достоверной этиологической расшифровки ВП методом ПЦР в классическом варианте и ПЦР в режиме «реального времени», отличающиеся высокой чувствительностью, возможностью количественного определения специфических фрагментов ДНК исследуемых пневмопатогенов в клиническом материале, автоматической регистрацией и интерпретацией полученных результатов.

Научно-практическая значимость работы. Тест-системы на основе разработанных праймеров для идентификации *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* методом ПЦР позволяют сократить сроки выявления в мокроте пневмопатогена до 1 суток (3–4 часа), на фоне многократно возрастающей чувствительности и специфичности.

Разработан алгоритм этиологической диагностики внебольничной пневмонии в зависимости от степени тяжести заболевания.

Положения, выносимые на защиту:

1. Значимо высокие показатели чувствительности и специфичности ПЦР в сравнении с культуральным методом позволяют использовать ПЦР в качестве метода «золотого» стандарта при лабораторной диагностике внебольничных пневмоний, вызываемых *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

2. Вне зависимости от степени тяжести ВП для экспресс-диагностики заболевания целесообразно использование качественной ПЦР, ориентированной на амплификацию гена 16S рРНК наиболее частых возбудителей ВП, а для получения количественных данных может применяться ПЦР в режиме «реального времени» с к генам 16S рРНК *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*.

Внедрение результатов работы в практику. Результаты исследования получены при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг., в рамках реализации мероприятия 1.2.1. Государственный контракт № П385 от 30 июля 2009 г. и внедрены в учебный процесс кафедр фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ, лабораторной диагностики ИПО БГМУ.

Апробация работы. Основные положения работы доложены и обсуждены на XVII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2010), конференции «Клиническая лабораторная диагностика» (Москва, 2010), VII всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2010» (Москва, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ. Из них 5 в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы исследования», «Собственные исследования», заключения, вы-

водов, практических рекомендаций, приложения, «Список используемой литературы» включает 104 отечественных и 97 зарубежных источника, приложения. Научная работа иллюстрирована 26 рисунками и 16 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Материалом для исследования послужили 196 образцов мокроты от больных, находившихся на стационарном лечении с диагнозом ВП, из них 30 человек в ГКБ № 5, 92 человека – МУГКБ № 21 и 74 человека в Клинике БГМУ г. Уфы, в возрасте от 18 до 80 лет, среди них 93 – мужчины и 103 – женщины. Отбор клинического материала от больных с установленным диагнозом «внебольничная пневмония» различной степени тяжести проводили в период с сентября 2009 по август 2011 года. У 29 больных была установлена ВП легкой степени тяжести, у 137 пациентов – средняя, а у 30 – тяжелая, из них у 30 больных ВП протекала с осложнениями (абсцесс, плеврит и др.).

Образцы мокроты у больных исследовали бактериологическим методом (БМ), ПЦР и ПЦР в режиме «реального времени. Поскольку формирование истинно контрольной группы в нашем случае было невозможным (отсутствие у практически здоровых людей мокроты), для более объективной оценки информативности методов исследования (БМ и ПЦР) было сформировано две группы сравнения, каждая из которых включала основную подгруппу и подгруппу сравнения. Первую основную подгруппу составили 196 больных с ВП различной степени тяжести, первую подгруппу сравнения 25 курящих мужчин (стаж курения не более 7 лет без признаков бронхита), сопоставимых по возрасту с основной подгруппой исследуемых. Вторую основную подгруппу составили больные с ВП средней и тяжелой степени тяжести – 167 человек, вторую подгруппу сравнения составили больные с ВП легкой степени тяжести – 29.

Для проведения сравнительного анализа информативности используемых методов детекции возбудителей ВП рассчитывали диагностическую эффективность по формулам А. Банержи (Банержи А., 2007). Для определения статистической достоверности отличия от равномерного распределения по данным таблицы рассчитывали критерий χ^2 с поправкой Йетса и его уровень значимости (Реброва, О.Ю., 2005).

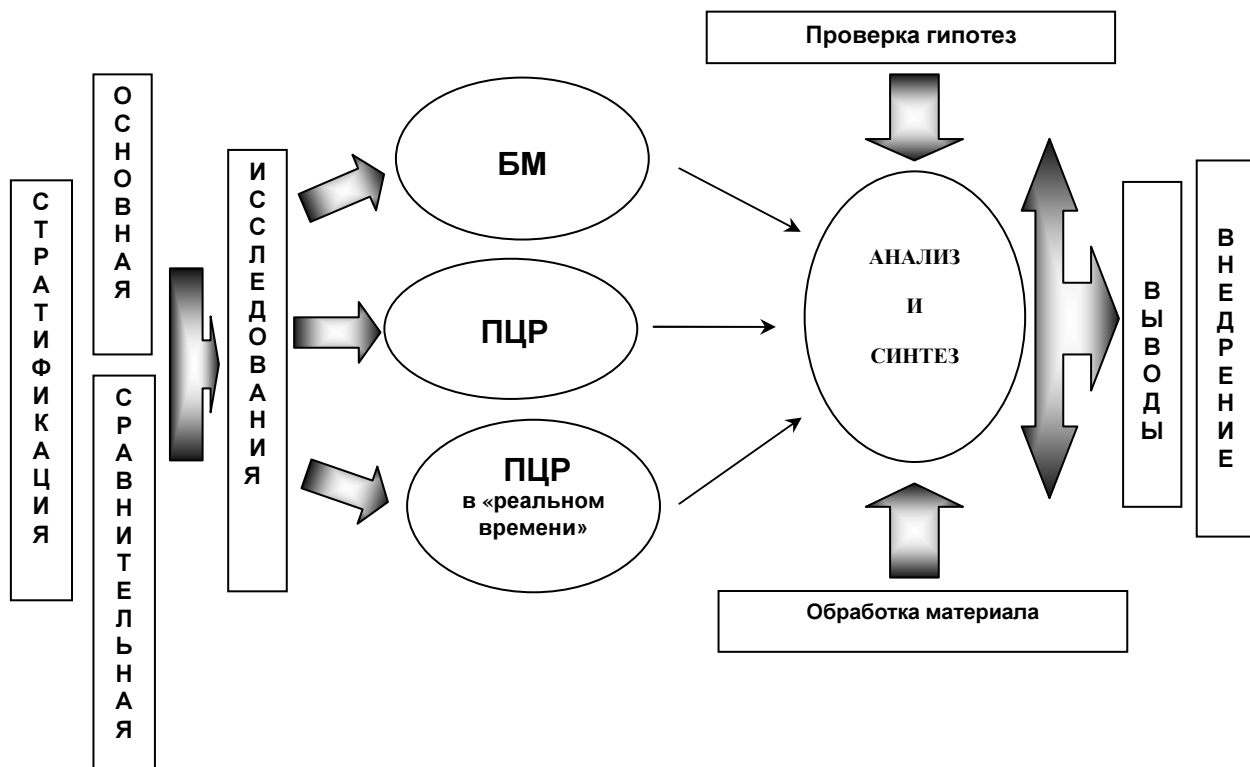


Рис. 1. Дизайн исследования

Результаты бактериологического исследования. Культуральным методом по результатам исследования мокроты было установлено, что этиологически внебольничная пневмония преимущественно обуславливалась смешанной бактериальной флорой (у 58 больных (29,6%)). У 28 больных (14,3%) в мокроте обнаружена *S.pneumoniae*, у 19 пациентов (9,7%) – *H.influenzae*. *K.pneumoniae* была выявлена у 11 обследованных (5,6%), *M.catarrhalis* – в 9 случаях (4,6%) и в 5 случаях (2,6%) в мокроте были обнаружены *P.aeruginosa* и *S.aureus*. Наименьшее количество положительных результатов высева имели место при ВП, вызванных *S.pyogenes* – 4 случая (2%). У 57 больных (29,0%) после проведения бактериологического исследования возбудитель установить не удалось. Для дальнейших расчетов информативности использованных лабораторных методов результаты в подгруппах сравнения (25 и 29 образцов) рассматривали в качестве ложноположительных.

Конструирование тест-систем. Для конструирования новых диагностических систем нами был осуществлен поиск и сравнительный анализ (программа «MegAlign», США) последовательностей ДНК ряда возбудителей ВП (*S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *S.pyogenes*,

S.aureus), представленных в международном банке нуклеотидных последовательностей EMBL/GenBank/DDBJ, с целью обнаружения наиболее консервативных (специфичность) и одновременно мультикопийных (чувствительность) участков. В результате этого был выбран ряд генов рибосомальных РНК и межгенного транскрибируемого спейсера к генам 16S рРНК, поскольку они всегда локализованы на хромосоме, медленно эволюционируют, а их продукты жизненно важны и функционально консервативны. Использование этих последовательностей в качестве мишеней для отжига праймеров при ПЦР позволяет с наибольшей достоверностью определять видовую принадлежность бактерий, избегая ошибок, связанных с генетической изменчивостью, в ходе ДНК-диагностики. В дальнейшем нами при использовании программы «PrimerSelect» из пакета компьютерных программ «Lasergene» («DNASTAR, Inc.», США) были подобраны пары олигонуклеотидных праймеров для детекции ряда возбудителей ВП – *S.pneumoniae* (Strepp), *H.influenzae* (Hem), *M.catarrhalis* (Mara) *K.pneumonia* (Kleb), *P.aeruginosa* (P.aerugin), *S.pyogenes* (SprRNA), *S.aureus* (S.aureus16) – к генам 16S рРНК.

Сконструированные праймеры были апробированы на музейных культурах *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *S.pyogenes*, *S.aureus*. Во всех случаях в ходе эксперимента имела место амплификация видоспецифических фрагментов ДНК заданного размера, тогда как в ходе амплификационного исследования бактерий других видов в 100% имели место отрицательные результаты ПЦР. Указанное позволило нам выдвинуть предположение о возможности использования созданных праймеров для видоспецифической детекции указанных пневмопатогенов в клиническом материале.

В результате применения сконструированных нами тест-систем для исследования методом ПЦР мокроты больных с ВП в 28,6% (56) случаев была выявлена смешанная бактериальная флора. Клинически заболевание при этом протекало в более тяжелой форме. В 19,9% (39) случаев при ВП методом ПЦР были выявлены *S.pneumoniae*, в 14,3% (28 больных) – *H.influenzae*, в 7,6% (15 больных) – *M.catarrhalis*, в 6,6% (13 пациентов) – *K.pneumoniae*, в 5,6% (11 больных) – *P.aeruginosa*. Специфические фрагменты ДНК *S.pyogenes* в мокроте были выяв-

лены в 3,6% (7 больных) случаев, *S.aureus* – в 2,6% (5 больных). У 22 больных (11,2%) результаты ПЦР с использованием всех сконструированных нами праймеров были отрицательны – этиологию ВП расшифровать не удалось.

В дальнейшем в соответствии с целью исследования, было проведено сравнение различий достоверности частот обнаружения указанных возбудителей ВП в мокроте культуральным и молекулярно-генетическим методами. При этом было установлено, что методом ПЦР частота обнаружения возбудителя была статистически значимо выше в сравнении с частотой их выявления культуральным методом у больных с ВП, вызванными *S.pneumoniae* ($\chi^2=118,04$, $p=0,0004$), *H.influenzae* ($\chi^2=101,07$, $p=0,00001$), *M.catarrhalis* ($\chi^2=39,18$, $p=0,00001$), *K.pneumonia* ($\chi^2=113,82$, $p=0,0002$), *P.aeruginosa* ($\chi^2=88,4$, $p=0,0005$) и *S.pyogenes* ($\chi^2=118,7$, $p=0,0001$). При диагностике ВП, обусловленной *S.aureus* результаты ПЦР и бактериологического исследования были идентичны – 2,6% (у 5 больных).

Таким образом, достоверно чаще при ВП методом ПЦР в мокроте обнаруживались *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis* (рис. 2).

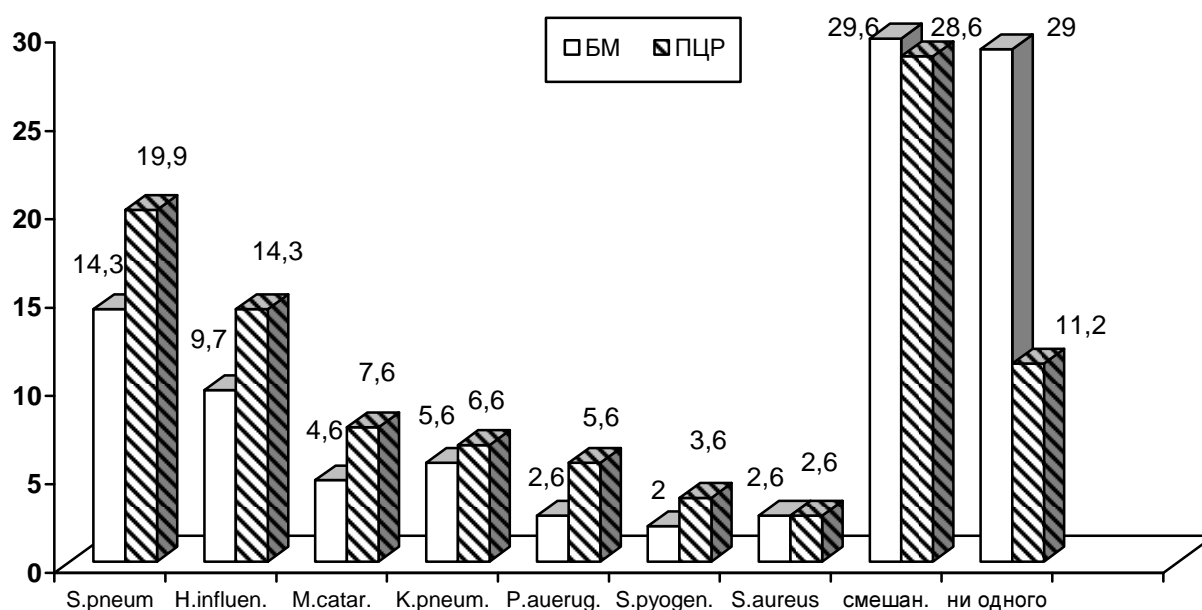


Рис. 2. Частота обнаружения возбудителей внебольничной пневмонии БМ и ПЦР

Для сравнительного анализа информативности бактериологического исследования и ПЦР первую группу сравнения составили 196 больных с ВП различной степени тяжести (первая основная подгруппа) и 25 курящих мужчин без признаков бронхита со стажем курения менее 7 лет (первая подгруппа сравнения).

В ходе сравнительного анализа показателей информативности лабораторных методов (ПЦР и БМ) в диагностике ВП в первой группе сравнения было показано, что ПЦР характеризовалась наибольшей диагностической эффективностью (95%) ($p=0,0036$), при диагностике ВП, вызванной *S.pneumoniae*, и обеспечивала статистически значимо более высокие чувствительность (94%) ($p=0,0032$), специфичность (96%) ($p=0,0185$), прогностическую ценность отрицательного результата (86%) ($p=0,0001$), по сравнению с результатами культурального исследования. Низкое значение показателя «разности рисков» (PP) (48%) при бактериологическом исследовании также свидетельствовало о низкой прогностической значимости его результата в сравнении с данными ПЦР (84%) ($p=0,00001$) (табл. 1).

Таблица 1

Информативность БМ и ПЦР при лабораторной диагностике ВП, вызванной *S.pneumoniae* в первой группе сравнения

Метод	4-хпольная таблица			ЧС, %	СП, %	ДЭ, %	ПЦ «+», %	ПЦ «-», %	PP, %	X ²	p
	результат	больные (n=71)	группа сравнения (n=25)								
БМ	+	54 (ИП)	4 (ЛП)	76**	84*	78**	93	55***	48***	25,4	0,0001
	-	17 (ЛО)	21 (ИО)								
ПЦР	+	67 (ИП)	1 (ЛП)	94**	96*	95**	98	86***	84***	68,8	0,0001
	-	4 (ЛО)	24 (ИО)								

*– статистически значимые отличия ($p<0,05$); **– статистически значимые отличия ($p<0,01$); ***– статистически значимые отличия ($p<0,001$).

Сравнение информативности БМ и ПЦР при диагностике ВП, обусловленной *H.influenzae* (в первой группе сравнения), также свидетельствовало о статистически значимо большей диагностической эффективности (92%) ($p=0,046$), чувствительности (92%) ($p=0,0185$), специфичности (92%) (0,05), прогностической ценности отрицательного результата (89%) ($p=0,0025$) «разности рисков» – 86% ($p=0,0006$) метода ПЦР (табл. 2).

Информативность БМ и ПЦР при лабораторной диагностике ВП, вызванной
H.influenzae в первой группе сравнения

Ме- тод	4-х польная таблица			ЧС, %	СП, %	ДЭ, %	ПЦ «+», %	ПЦ «-», %	РР, %	X ²	p
	ре- зультат	больные (n=50)	группа сравне- ния (n=25)								
БМ	+	37 (ИП)	5 (ЛП)	74*	80	76*	88	61**	49**	17,5	0,00001
	-	13 (ЛО)	20 (ИО)								
ПЦР	+	46 (ИП)	2 (ЛП)	92*	92	92*	96	85**	81**	43,6	0,00001
	-	4 (ЛО)	23 (ИО)								

*– статистически значимые отличия (p<0,05); **– статистически значимые отличия (p<0,01); ***– статистически значимые отличия (p<0,001).

Показатели информативности бактериологического исследования при диагностике ВП, вызванной *M.catarrhalis*, также значительно уступали информативности ПЦР в первой группе сравнения. В частности при исследовании мокроты при ВП указанной этиологии методом ПЦР показатели чувствительности (92%) (p=0,0002), диагностической эффективности (93%) (p=0,0074), «разности рисков» – 86% (p=0,0006) были статистически значимо выше по сравнению с данными показателями при использовании БМ (табл. 3).

При лабораторной диагностике ВП, ассоциированной с *K.pneumonia*, ПЦР также характеризовалась статистически значимо (p<0,05) более высокой чувствительностью (92%) (p=0,03), диагностической эффективностью (92%) (p=0,046), «разностью рисков» – 83% (p=0,0006) по сравнению с данными показателями БМ (в первой группе сравнения).

При сравнительной оценке информативности обнаружения *P. aeruginosa* в мокроте при ВП культуральным методом и ПЦР прогностическая ценность положительного результата была одинакова для каждого из этих методов (100%) (ложноположительные результаты отсутствуют). Однако показатель «разности рисков» (96%) (p=0,05) был статистически значимо выше при ПЦР

по сравнению с БМ вследствие меньшей чувствительности последнего (55%) ($p=0,005$) в первой группе сравнения.

Таблица 3

Информативность БМ и ПЦР при лабораторной диагностике ВП,
вызванной *M.cattarrhalis* в первой группе сравнения

Ме- тод	4-хпольная таблица			ЧС, %	СП, %	ДЭ, %	ПЦ «+», %	ПЦ «-», %	PP, %	X ²	p
	ре- зул- тат	боль- ные (n=36)	группа сравне- ния (n=25)								
БМ	+	18 (ИП)	2 (ЛП)	50***	92	67**	90	56**	46***	9,9	0,0016
	-	18 (ЛО)	23 (ИО)								
ПЦР	+	33 (ИП)	1 (ЛП)	92***	96	93**	97	89**	86***	42,5	0,00001
	-	3 (ЛО)	24 (ИО)								

*– статистически значимые отличия ($p<0,05$); **– статистически значимые отличия ($p<0,01$); ***– статистически значимые отличия ($p<0,001$).

При диагностике ВП, вызванной *S. pyogenes*, методом ПЦР показатель чувствительности (85%) был таким же, как при БМ, а показатели специфичности (96%), прогностической ценности положительного (96%) и отрицательного результатов (86%), диагностической эффективности (90%) были незначительно выше, чем при БМ (специфичность – 88%, прогностическая ценность положительного – 88% и отрицательного результатов – 85%, диагностическая эффективность – 86%), однако, указанные различия в первой группе сравнения были статистически незначимы.

При использовании ПЦР в лабораторной диагностике ВП, ассоциированной с *S.aureus*, чувствительность ($p=0,03$), специфичность ($p=0,05$) и «разность рисков» ($p=0,00001$) в первой группе сравнения составили 100% (за счет отсутствия ложноположительных результатов), что было статистически значимо выше, чем при применении БМ.

Для повышения объективности оценки информативности БМ и ПЦР в диагностике ВП различной степени тяжести была сформирована вторая группа

сравнения, которую составили 167 больных с ВП средней и тяжелой степени тяжести (вторая основная подгруппа) и 29 пациентов с клиническим диагнозом – ВП легкой степени тяжести (вторая подгруппа сравнения).

Во второй группе сравнения методов при диагностике ВП с учетом степени тяжести заболевания информативность ПЦР была статистически значимо выше при патологии легких, обусловленной *S.pneumoniae* чувствительность (97%, $p=0,0008$), диагностическая эффективность (95%, $p=0,0071$) (табл. 4); *H.influenzae* чувствительность (94%, $p=0,0056$), диагностическая эффективность (93%, $p=0,05$) (табл. 5) и *M.catarrhalis* (табл. 6).

Таблица 4

Информативность БМ и ПЦР при лабораторной диагностике ВП, вызванной *S. pneumoniae*, в зависимости от степени тяжести

Метод	4-хпольная таблица			ЧС, %	СП, %	ДЭ, %	ПЦ «+», %	ПЦ «-», %	РР, %	X ²	p
	результат	больные (n=66)	группа сравнения (n=29)								
БМ	+	51 (ИП)	5 (ЛП)	77***	83	79**	91	61***	53***	27,6	0,002
	-	15 (ЛО)	24 (ИО)								
ПЦР	+	64 (ИП)	3 (ЛП)	97***	90	95**	95	93***	88***	68,6	0,0001
	-	2 (ЛО)	26 (ИО)								

*– статистически значимые отличия ($p<0,05$); **– статистически значимые отличия ($p<0,01$); ***– статистически значимые отличия ($p<0,001$).

Информативность ПЦР в диагностике ВП, вызванной *K.pneumonia*, также была статистически значимо выше информативности БМ (чувствительность (97%, $p=0,04$), диагностическая эффективность (97%, $p=0,05$), прогностическая ценность отрицательного результата (96%, $p=0,01$), «разность рисков» (83%, $p=0,001$). При сравнительном анализе указанных методов лабораторной диагностики ВП, обусловленной *P.aeruginosa*, во второй группе сравнения показаны более высокие значения чувствительности (95%, $p=0,02$), прогностической значимости отрицательного результата (100%, $p=0,05$) и значения «разности рис-

ков» (97%, $p=0,0001$) при ПЦР, тогда показатели специфичности ПЦР и БМ совпадали (96%).

Таблица 5

Информативность БМ и ПЦР при лабораторной диагностике ВП, вызванной *H.influenzae*, в зависимости от степени тяжести.

Метод	4-хпольная таблица			ЧС, %	СП, %	ДЭ, %	ПЦ «+», %	ПЦ «-», %	РР, %	X^2	p
	результат	больные (n=47)	группа сравнения (n=29)								
БМ	+	34 (ИП)	3 (ЛП)	72**	89	79*	92	67**	58**	25,2	0,0002
	-	13 (ЛО)	26 (ИО)								
ПЦР	+	44 (ИП)	2 (ЛП)	94**	93	93*	96	90**	86**	52,8	0,00001
	-	3 (ЛО)	27 (ИО)								

*– статистически значимые отличия ($p<0,05$); **– статистически значимые отличия ($p<0,01$); ***– статистически значимые отличия ($p<0,001$).

Таблица 6

Информативность БМ и ПЦР при лабораторной диагностике ВП, вызванной *M.catarrhalis*, в зависимости от степени тяжести.

Метод	4-хпольная таблица			ЧС, %	СП, %	ДЭ, %	ПЦ «+», %	ПЦ «-», %	РР, %	X^2	p
	результат	больные (n=33)	группа сравнения (n=29)								
БМ	+	13 (ИП)	4 (ЛП)	39***	86	61**	76*	55***	32***	3,9	0,0489
	-	20 (ЛО)	25 (ИО)								
ПЦР	+	31 (ИП)	2 (ЛП)	94***	93	93**	94*	93***	87***	43,5	0,00001
	-	2 (ЛО)	28 (ИО)								

*– статистически значимые отличия ($p<0,05$); **– статистически значимые отличия ($p<0,01$); ***– статистически значимые отличия ($p<0,001$).

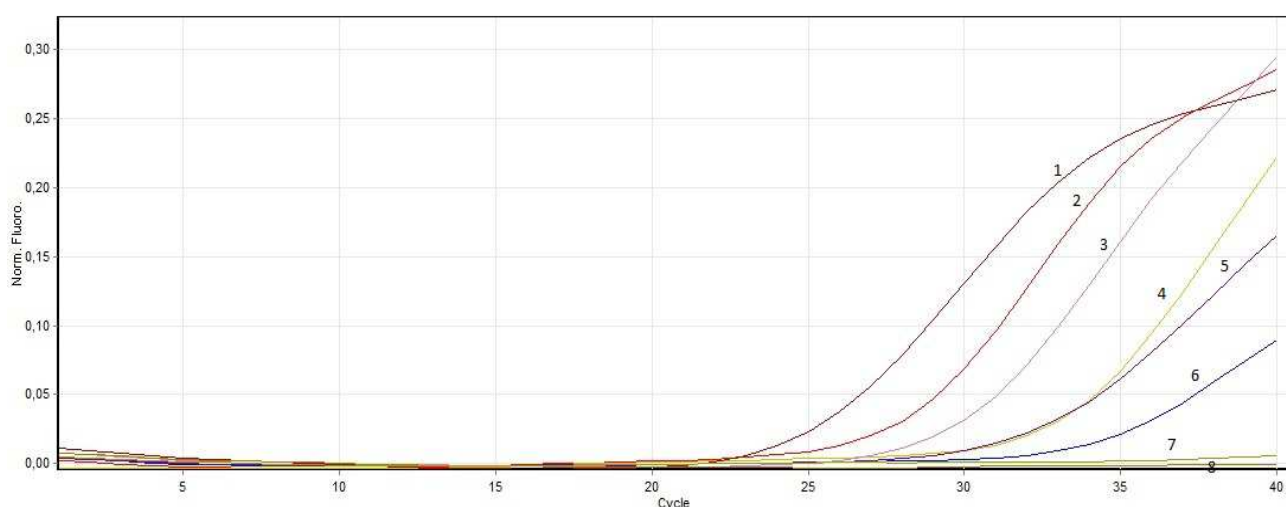
Аналогично более высокими показателями характеризовалась информативность ПЦР: чувствительность (91%), специфичность (90%), диагностическая

эффективность (92%) при диагностике ВП, вызванной *S.pyogenes*, однако, в результате незначительности различий ошибок второго ряда при ПЦР и БМ различия информативности указанных методов были статистически незначимы.

Тогда как при лабораторной диагностике ВП, ассоциированной с *S.aureus*, различия в информативности ПЦР были статистически значимыми: чувствительность – 100% ($p=0,006$), прогностическая ценность отрицательного результата – 100% ($p=0,05$) и «разность рисков» – 95%, ($p=0,00001$). Таким образом, у пациентов с ВП различной этиологии и различной степени тяжести для ПЦР были показаны значимо большие показатели диагностической эффективности, чувствительности, специфичности, а также прогностической ценности отрицательного и положительного результатов.

В ходе антибактериальной терапии ВП большое значение приобретает количественная информация о микробной «нагрузке» (обсемененности) клинического материала. Применение для решения указанной задачи БМ (метод «серийных» разведений и др.) сопряжено с теми же проблемами, что и культуральная детекция возбудителя в мокроте. Учитывая это, нами была предпринята попытка разработки способа количественного определения в мокроте наиболее частых пневмопатогенов (*S.pneumoniae* и *H.influenzae*) с использованием молекулярно-генетических методов, в частности ПЦР в режиме «реального времени». Для этого нами были подобраны соответствующие олигонуклеотидные последовательности к видоспецифическим участкам ДНК *S.pneumoniae* и *H.influenzae* (Strep. pneum, Hem infl) для ПЦР в режиме «реального времени». При этом мы впервые использовали FRET-эффект, отличающийся использованием близко расположенных меченых праймеров и обеспечивающий резонансный перенос флуорисцентной энергии на платформе «УФА» (Универсальная Флуорисцентная Амплификация). Для каждого исследуемого клинического образца при этом составлялся индивидуальный график амплификации через определенные промежутки времени, выводимый на экран монитора, который позволял получать данные об исходном количестве искомым ДНК-матриц в порции материала (мокроты). В результате проведенных исследований было показано, что ПЦР в режиме «реального времени» имела ещё большую чувствительность при максимально возможной специфичности, нежели

ПЦР с электрофоретической детекцией. В частности порог «чувствительности» при количественном варианте ПЦР превышал порог «чувствительности» качественной ПЦР (10^3 – 10^4 /мл) (рис. 3).



1 – чистая культура *S.pneumoniae*; 2, 3 – положительные образцы *S.pneumoniae*; 5 – чистая культура *H.influenzae*; 4, 6 – положительные образцы *H.influenzae*; 7, 8 – отрицательные образцы на оба пневмопатогена.

Рис. 3. Кривые плавления при постановке ПЦР в реальном времени

Более того при использовании ПЦР в режиме «реального времени» с FRET-эффектом на платформе «УФА» и разработанными нами праймерами к *S.pneumoniae* и *H.influenzae* существенно снижались риски контаминации и «ложноположительных» результатов ввиду одностадийной детекции результата в формате закрытых пробирок. Этот подход позволил существенно сократить продолжительность и трудоемкость исследований.

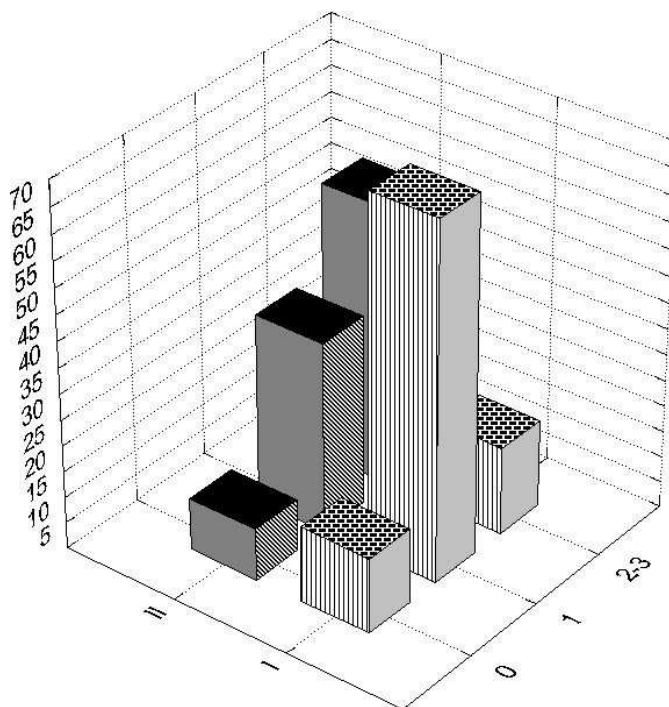
Представленные выше данные сравнительной оценки информативности ПЦР и бактериологического метода в диагностике внебольничной пневмонии послужили основанием для пересмотра современных представлений об их этиологической структуре. В частности, в подтвержденных методом ПЦР случаях ВП пневмококковой этиологии анамнестически имели место острое начало, выраженная температурная реакция, боли в области грудной клетки, кашель, выраженная интоксикация, долевыми и более обширными поражениями легочной ткани, с достаточно быстрым распространением процесса в участке, ограниченным плеврой. Тогда как при доказанных методом ПЦР внебольничных

пневмониях, вызванных *H.influenzae*, воспалительный процесс чаще носил очаговый характер, по интенсивности – преимущественно средней тяжести, редко, сопровождавшийся экссудативным плевритом. В анамнезе имели место курение и хронический бронхит. Случаи ВП, подтвержденные ПЦР-детекцией в мокроте *K.pneumonia*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, отличались тяжелым течением, отсутствием температурной реакции у пациентов, выраженным кашлевым рефлексом, сопровождались обширным поражением легочной ткани и осложнялись деструктивной пневмонией, абсцессами, плевритом, сепсисом. Все указанные пациенты находились на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии с констатированными в анамнезе фактами алкоголизма, наркомании и сахарного диабета. Тогда как случаи внебольничной пневмонии, вызванной *S.pyogenes* или *M.catarrhalis*, верифицированные методом ПЦР с нашими праймерами клинических особенностей не имели.

Поскольку ВП часто имеют смешанную этиологию, на информативность и прогностическую ценность ПЦР в диагностике могли влиять варианты видовых сочетаний пневмопатогенов, что послужило основанием для дополнительных расчетов. Для этого был использован метод синдромального анализа (SAND) и метод построения многопольных таблиц кросстабуляции с расчетом коэффициента корреляции качественных признаков Крамера (V). Для каждого из 196 образцов было подсчитано количество одномоментно обнаруженных видов пневмопатогенов. При использовании ПЦР количество выявленных видов варьировало от 0 до 3 в следующей пропорции: 0 – 11,2%; 1 – 60,2%; 2 – 27,6% и 3–1%. При этом показана высоко достоверная ($V=0,36$, $p<0,0002$) корреляция между количеством видов и наличием либо отсутствием осложнений ВП (рис. 4). Так при отсутствии осложнений один вид возбудителя обнаруживался в мокроте методом ПЦР существенно и значимо чаще, чем при наличии осложнений: 68,7% против 36,7%, $p<0,001$. И, наоборот, при одновременном обнаружении методом ПЦР в мокроте двух и более видов микроорганизмов чаще имели место осложнения (14,3% против 53,3% ($p<0,0001$)). Таким образом, выявление в мокроте больного более чем одного пневмопатогена соответствовало более высокой вероятности появления осложнений.

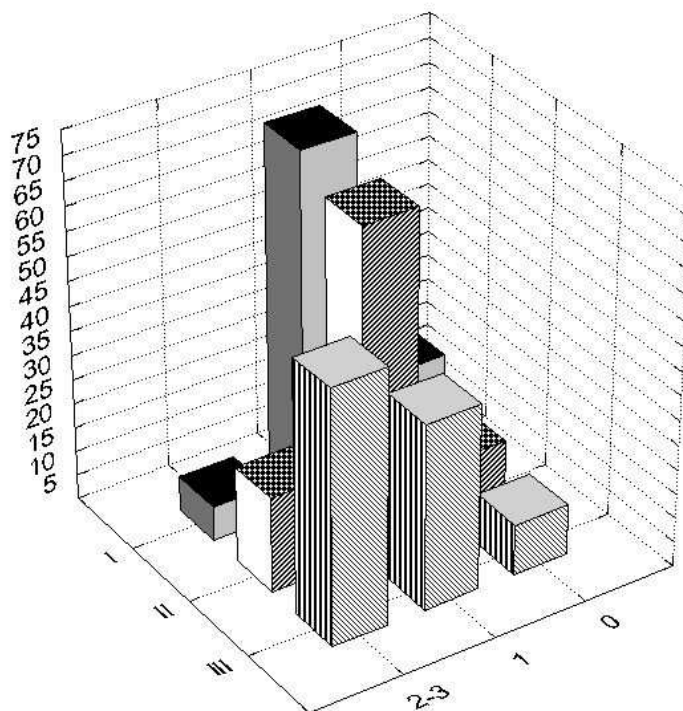
Указанная закономерность нашла подтверждение и при использовании БМ. Моноинфекция статистически значимо ($p < 0,05$) чаще имела место при отсутствии осложнений – 47,5% против 30%. При микстинфекциях соотношение обратное: 20,5% без осложнений против 50% с осложнениями ($p < 0,0004$). Однако корреляция между появлением осложнений ВП и количеством видов пневмопатогенов, выявленных БМ ($V = 0,24$, $p < 0,02$) была ниже, чем при использовании ПЦР и статистически значимо не отличалась от нее ($p > 0,09$).

При оценке связи степени тяжести ВП и числом обнаруживаемых методом ПЦР в мокроте видов возбудителей ВП корреляция составила 0,26 ($p < 0,001$) (рис. 5).



Римской цифрой «I» обозначены случаи отсутствия осложнений, цифрой «II» – случаи осложнений. Число возбудителей ВП обозначено арабскими цифрами: 0 – ни одного возбудителя, 1 – один возбудитель из семи, 2–3 – два и более возбудителя. По оси ординат указана процентная доля встречаемости различного числа пневмопатогенов при каждом из вариантов «исхода».

Рис. 4. Частота встречаемости осложнений при ВП и количеством видов пневмопатогенов, обнаруживаемых в мокроте методом ПЦР



Римскими цифрами обозначена степень тяжести ВП: I – легкая, II – средняя, III – тяжелая. Число обнаруженных возбудителей ВП обозначено арабскими цифрами: 0 – ни одного возбудителя, 1 – один возбудитель из семи, 2–3 – два и более возбудителя. По оси ординат указана процентная доля встречаемости различного числа пневмопатогенов при каждой степени тяжести.

Рис. 5. Частота встречаемости вариантов тяжести течения ВП и количеством видов пневмопатогенов, обнаруживаемых методом ПЦР

При ВП неустановленной этиологии чаще имело место легкое течение заболевания (41,4%) и реже – среднетяжелое (29%) и тяжелое (20,7%). Однако все эти различия статистически незначимы ($p > 0,05$). Аналогичная тенденция имела место для случая моноинфекции. Частота случаев ВП легкой, средней и тяжелой степени тяжести составляла 51,7%, 46,4% и 31%, соответственно, и статистически значимо также не различалась. Существенной эта разница становилась лишь в случаях микстинфекции, при которой тяжелые формы ВП имели место в 49,3%, среднетяжелые – в 23,9%, а легкие – всего в 7% случаев. Указанные различия были статистически значимы ($p < 0,03$ и менее), корреляция между тяжестью и количеством видов возбудителей ВП была статистически достоверна: $V = 0,19$, $p < 0,03$.

Расчет корреляций и анализ таблиц кросстабуляции показал, что связь между количеством, обнаруживаемых в мокроте видов возбудителей ВП и наличием либо отсутствием осложнений или тяжестью течения пневмонии существует, но наиболее выражена для случая корреляции осложнений при использовании метода ПЦР.

Таким образом, вне зависимости от длительности и тяжести течения ВП диагностическая информативность ПЦР с подобранными нами праймерами к *S.pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* статистически достоверно выше аналогичных показателей при культуральном исследовании по основным критериям эффективности лабораторного исследования. ПЦР в режиме «реального времени», является эффективным, высокочувствительным и специфичным методом, дополняющим круг существующих способов диагностики данного заболевания, в том числе и при начатом лечении.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны и апробированы олигонуклеотидные праймеры к гену 16S рРНК возбудителей внебольничной пневмонии: *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *S.pyogenes*, *S.aureus*, позволяющие идентифицировать данные пневмопатогены при проведении классической полимеразной цепной реакции, а также высокоспецифичные праймеры к гену 16S рРНК *S.pneumoniae*, *H.influenzae* для их количественного определения методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени».

2. При использовании полимеразной цепной реакции с собственными праймерами для этиологической диагностики внебольничной пневмонии по сравнению с культуральным методом установлена значимо более высокая частота обнаружения пневмопатогенов: *S.pneumoniae* ($p=0,0004$), *H.influenzae* ($p=0,00001$), *M.catarrhalis* ($p=0,00001$), *K.pneumonia* ($p=0,0002$), *P.aeruginosa* ($p=0,0005$) и *S.pyogenes* ($p=0,0001$). При диагностике внебольничной пневмонии, обусловленной *S.aureus*, результаты полимеразной цепной реакции и бактериологического исследования идентичны – 2,6%.

3. Метод полимеразной цепной реакции с разработанными праймерами в отличие от культурального метода характеризуется большими значениями показателей информативности («диагностическая эффективность», «чувствительность», «специфичность», прогностическая ценность «отрицательного» и/или «положительного» результатов и «разность рисков») при диагностике внебольничной пневмонии, вызванной *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* и *S.aureus* и идентичными – при внебольничной пневмонии, вызванной *S.pyogenes*.

4. Чувствительность полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» с FRET-эффектом на платформе «УФА» (Универсальная Флюорисцентная Амплификация) с подобранными праймерами к видоспецифическим участкам ДНК *S.pneumoniae* и *H.influenzae* превышает порог «чувствительности» качественной полимеразной цепной реакции (10^3 – 10^4 /мл) и обеспечивает количественные данные, необходимые для контроля эффективности лечения.

5. Между количеством видов выявленных в мокроте методом полимеразной цепной реакции возбудителей внебольничной пневмонии и наличием либо отсутствием осложнений и тяжестью течения заболевания установлена более выраженная, достоверная прямая связь, чем при бактериологическом исследовании.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При внебольничных пневмониях у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания для этиологической расшифровки заболевания более информативно назначение исследования мокроты методом полимеразной цепной реакции с праймерами к *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *S.pyogenes*, *S.aureus* в различные периоды заболевания.

2. У больных с легкими формами течения внебольничной пневмонии для этиологической диагностики может применяться как бактериологический метод, так и полимеразная цепная реакция.

3. При лабораторно подтвержденных внебольничных пневмониях, вызванных *S.pneumoniae* и *H.influenzae*, для контроля эффективности лечения необходимо применение полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» как метод, позволяющий оценивать количественную динамику («бактериальная нагрузка»).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Мирсаяпова, И.А. Сравнительная характеристика клинико-лабораторных особенностей пневмоний бактериальной и бактериально-вирусной природы / И.А. Мирсаяпова, А.Ф. Ишмухаметова // ЛОМОНОСОВ: материалы XVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. <http://lomonosov-msu.ru/rus/arhive.html>.
2. Разработка способов молекулярной детекции *P. aeruginosa* при инфекциях нижних дыхательных путей / А.Р. Мавзютов, И.А. Мирсаяпова, Г.Ф. Хасанова [и др.] // **Клиническая лабораторная диагностика.** – 2010. – № 9. – С. 38.
3. Диагностические возможности молекулярной детекции *P. aeruginosa* и *S. maltophilia* у больных внебольничной пневмонией / А.Р. Мавзютов, И.А. Мирсаяпова, А.Х. Баймиев [и др.] // Молекулярная диагностика. – 2010. – № 2: спец. выпуск: Сборник трудов VII всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – С. 422.
4. Полимеразная цепная реакция в диагностике внебольничной пневмонии / И.А. Мирсаяпова, А.Р. Мавзютов, А.Х. Баймиев, А.Ф. Ишмухаметова // **Клиническая лабораторная диагностика.** – 2011. – № 9. – С. 45.
5. Диагностические возможности молекулярной детекции *Streptococcus ruogenes* у больных внебольничной пневмонией / И.А. Мирсаяпова, А.Р. Мавзютов, А.Х. Баймиев, А.Ф. Ишмухаметова // **Клиническая лабораторная диагностика.** – 2011. – № 9. – С. 45.
6. Разработка и использование тест-систем для молекулярно-генетической детекции минорных возбудителей внебольничной пневмонии / И.А. Мирсаяпова, А.Р. Мавзютов, А.Х. Баймиев [и др.] // **Журнал Микробиологии эпидемиологии и иммунологии.** – 2011. – № 6. – С. 69–72.
7. Разработка тест-систем для детекции возбудителей внебольничной пневмонии на основе молекулярно-генетических методов / А.Р. Мавзютов, И.А. Мирсаяпова, А.Х. Баймиев [и др.] // Материалы III Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. – 2010. – С. 247–248.
8. Разработка способов молекулярной детекции *Acinetobacter spp* / А.Р. Мавзютов, Г.Ф. Хасанова, И.А. Мирсаяпова, Н.В. Жарикова // **Клиническая лабораторная диагностика.** – 2011. – № 9. – С. 48.

Мирсаяпова Ирина Анатольевна

**РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
КАЧЕСТВЕННОЙ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ДЕТЕКЦИИ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Издательская лицензия № 06788 от 01.11.2001 г.

ООО «Издательство «Здравоохранение Башкортостана»

450000, РБ, г. Уфа, а/я 1293; тел.: (347) 250-81-20; тел./факс (347) 250-13-82.

Подписано в печать 10.02.2012 г.

Формат 60×84/16. Гарнитура Times New Roman.

Бумага офсетная. Отпечатано на ризографе.

Усл. печ. л. 1,4. Уч.-изд. л. 1,5.

Тираж 100. Заказ № 680.