

ПРИМЕНЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН

© Т.А. Хуснутдинова¹, Ю.А. Савочкина², Е.В. Шипицына¹, А.Е. Гуцин², А.М. Савичева¹

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им.Д.О. Отта» СЗО РАМН;

²ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Резюме. Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) относятся к наиболее распространенным инфекционным заболеваниям и нередко осложняют течение беременности. Выделяют три формы инфекций мочевыводящих путей при беременности: бессимптомная бактериурия (ББ), цистит, пиелонефрит. Скрининг на ББ входит в стандарты акушерской помощи и включен в международные рекомендации. Основным методом диагностики ИМП является исследование на наличие бактерий в моче культуральным методом, который считается «золотым» стандартом. Использование молекулярно-биологических методов для выявления и идентификации микроорганизмов и количественного определения их содержания в моче является эффективной и современной альтернативой традиционным бактериологическим исследованиям.

Ключевые слова: инфекции мочевыводящих путей; бессимптомная бактериурия; диагностика.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) относятся к наиболее распространенным инфекционным заболеваниям и нередко осложняют течение беременности, родов, послеродового периода, а также влияют на состояние плода и здоровье новорожденного. В течение жизни до 60 % женщин сталкиваются хотя бы с одним эпизодом ИМП. У каждой четвертой пациентки в течение года ИМП рецидивирует. За последние 20 лет количество беременных с заболеваниями почек возросло в 4 раза [3, 6, 13].

Высокий риск развития ИМП во время беременности и возникновение осложнений связаны с анатомо-физиологическими изменениями в организме женщины. Уже начиная с 8-й недели беременности, мочевой пузырь смещается кпереди и кверху, начинают расширяться почечные лоханки, расширяются (верхние отделы) и удлиняются мочеточники. Механическое сдавление растущей маткой и расслабление гладкой мускулатуры вследствие действия прогестерона приводит к формированию физиологического гидронефроза беременных. Из-за снижения тонуса и перистальтики мочеточников замедляется скорость пассажа мочи. Снижение тонуса мочевого пузыря, увеличение количества остаточной мочи способствует пузырно-мочеточниковому рефлюксу. Бактериальному росту также способствуют изменения физико-химических свойств мочи (увеличение pH, концентрации эстрогенов, возможна глюкозурия, связанная с увеличением клубочковой фильтрации глюкозы, превышающей реабсорбцию ее канальцами) [10]. Эти изменения в организме женщины способствуют восходящему распространению бак-

терий из уретры, колонизированной собственной кишечной и вагинальной микрофлорой.

Развитие ИМП во время беременности и отсутствие своевременного лечения может приводить к развитию серьезных осложнений со стороны матери и плода, таких как анемия, гипертензия, преждевременное излитие околоплодных вод, преждевременные роды, рождение детей с низкой массой тела, что в свою очередь приводит к повышению перинатальной смертности в 3 раза [1, 6, 19].

Выделяют три основные нозологические формы ИМП у беременных: бессимптомная бактериурия, острый цистит и пиелонефрит.

Острый цистит встречается у 1–4 % беременных, характеризуется воспалением слизистой мочевого пузыря и наличием характерных жалоб (боль внизу живота, поллакиурия, пиурия, гематурия) [12]. Острый пиелонефрит — это наиболее тяжелая форма ИМП, во время беременности развивается у 1–2 % женщин, сопровождается повреждением почечной паренхимы и чашечно-лоханочного аппарата почки. Женщина может предъявлять жалобы на боли в поясничной области, повышение температуры тела, тошноту, рвоту, учащенное мочеиспускание. Примерно у 1/3 пациенток, страдающих хроническим пиелонефритом, отмечается обострение существующего до беременности заболевания. Наличие пиелонефрита неблагоприятно сказывается на течении беременности и ее исходах [6].

Бессимптомная бактериурия (ББ) — это микробиологический диагноз, который основывается на результатах культивирования образца мочи, собранной с максимальным соблюдением стерильности и доставленной в лабораторию в предельно

короткие сроки. ББ встречается как у небеременных женщин, так и во время беременности, в 2–10% случаев, характеризуется отсутствием жалоб и обнаружением в моче микроорганизмов (бактериурия) в значимом количестве. ББ у беременных является фактором риска развития пиелонефрита и требует своевременной диагностики и назначения адекватного лечения. При отсутствии своевременно назначенного лечения у 20–40% беременных женщин с ББ возможно развитие острого пиелонефрита во II и III триместрах беременности. Но при назначении лечения вероятность развития пиелонефрита снижается до 3% [14, 21].

Спектр возбудителей, выявляемых в моче беременных, практически не отличается от спектра возбудителей ИМП у небеременных женщин. Наиболее часто выявляется *Escherichia coli* (70–80%); другие представители бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* spp., *Proteus* spp.), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. выделяются реже [7, 9, 20].

Учитывая высокую вероятность развития восходящей ИМП у беременных с ББ, возможность развития осложнений во время беременности, всем пациенткам показано скрининговое обследование и лечение бессимптомной бактериурии беременных на ранних сроках беременности. Скрининг и лечение ББ при беременности входит в стандарты акушерской помощи по всему миру [8, 15, 16, 17]. В нашей стране необходимость скрининга беременных на бактериурию регламентирована Приказом Минздрава России № 572 от 2012 года «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология» [2].

Основным методом диагностики ИМП является исследование на наличие бактерий в моче культуральным методом, который считается «золотым» стандартом. Однако этот метод является трудоемким, длительным, требующим особых условий культивирования и идентификации микроорганизмов. Для диагностики ИМП важно определить количество бактерий, обнаруженных в мочевыводящих путях. При ББ в моче обнаруживают один и тот же патоген в количестве 10^5 КОЕ/мл и более в двух пробах мочи, взятых с интервалом более 24 часов [8, 11].

Существуют ускоренные методы диагностики — микроскопическое исследование мочи, нитритный тест, определение эстеразы лейкоцитов. Эти методы имеют низкую чувствительность и специфичность, поэтому их применение ограничено. При сравнении с культуральным исследованием чувствительность нитритного теста, основанного на превраще-

нии нитратов в нитриты под действием в основном грамотрицательных микроорганизмов, присутствующих в моче, составляет 35–85%, при высокой специфичности (92–100%). Чувствительность теста определения эстеразы лейкоцитов, выделяемой при разрушении лейкоцитов, составляет 72–97%, специфичность — 64–82%. Чувствительность этого теста при обследовании беременных женщин всего около 50%. Чувствительность микроскопического исследования осадка мочи составляет 83%, специфичность — 59% [4, 5, 14, 18].

В настоящее время использование молекулярно-биологических методов для выявления и идентификации микроорганизмов и количественного определения их содержания в биологическом материале является эффективной и современной альтернативой традиционным бактериологическим исследованиям. Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет определять количественное содержание микроорганизмов в исследуемом материале. Разработка и внедрение новых методов на основе количественного анализа ДНК возбудителей ИМП в моче с помощью ПЦР-РВ позволит сократить сроки проведения исследования, повысить уровень стандартизации процедуры исследования и точности получаемых результатов. Кроме того, широкая сеть лабораторий различных лечебно-профилактических учреждений, оснащена необходимым оборудованием, и на постоянной основе выполняет исследования методом ПЦР-РВ.

Целью данного исследования явилась оценка методики на основе количественной ПЦР-РВ для выявления возбудителей ИМП в моче у беременных женщин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было проведено ретроспективное исследование мочи, полученной от беременных женщин в разные сроки беременности, поступивших в отделения патологии беременности ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. Образцы средней порции мочи хранили при температуре -70 °C до проведения ПЦР-исследования. Бактериологическое исследование проводили с использованием 5%-го кровяного агара с определением числа микробных клеток в 1 мл мочи. Значимой бактериурией считали содержание бактерий не менее 10^5 КОЕ/мл. Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS, BRUKER Daltonics, Германия).

Образцы мочи анализировали методом количественной ПЦР-РВ с помощью апробируемых на-

боров «АмплиСенс ИМП-скрин», «АмплиСенс ИМП-Грам (-)» и «АмплиСенс ИМП-Грам (+)», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Москва. Экстракцию ДНК проводили с помощью набора «РИБО-преп». ПЦР-РВ проводили с помощью амплификатора «Rotor-Gene 6000» в соответствии с инструкциями к наборам реагентов.

Апробируемая методика включает проведение трех ПЦР-тестов. Первый тест «АмплиСенс ИМП-скрин», используемый при скрининге бактериурии, позволяет определять содержание в образце мочи *E. coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и общее содержание ДНК бактерий. Для образцов, в которых выявлено значимое количество ДНК бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (превышающее содержание ДНК *E. coli*) или общей ДНК бактерий, проводятся два ПЦР-теста второй линии «АмплиСенс ИМП-Грам (-)» и «АмплиСенс ИМП-Грам (+)», с помощью которых определяется содержание ДНК *Klebsiella pneumoniae/K.oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* и *Enterococcus spp.*

На основании сравнения результатов, полученных методом ПЦР-РВ с результатами бактериологического исследования, для определения проб со значимой бактериурией были выбраны критерии интерпретации результатов для количественного ПЦР-анализа: содержание ДНК *E. coli*, ДНК бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, ДНК *S. saprophyticus* от 2×10^5 ГЭ/мл и содержание общей ДНК бактерий от 1×10^6 ГЭ/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего было протестировано 568 проб мочи, из них значимая бактериурия была выявлена в 27 пробах мочи. Распространенность значимой бактериурии составила 4,8%. Наиболее часто была обнаружена *E. coli* — 51,8%, *Enterococcus spp.* — 25,9%. Другие

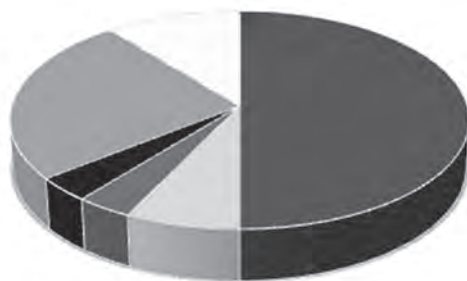


Рис. 1. Возбудители ИМП, выявленные при значимой бактериурии

Таблица 1

Сравнение результатов метода ПЦР-РВ и бактериологического метода

Результат бактериологического исследования (n)	Совпадение результатов ПЦР-РВ и посева
Значимая бактериурия	26 (96 %)
Значимая бактериурия, обусловленная бактериями семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	17 (100 %)
Не обнаружено значимой бактериурии	464 (85,8 %)

микроорганизмы обнаруживались реже (рис. 1).

На основании сравнения результатов, полученных методом ПЦР-РВ, с результатами бактериологического исследования были получены высокие показатели совпадения результатов, полученных методом ПЦР-РВ и бактериологическим методом, которые представлены в таблице 1.

По результатам бактериологического исследования значимая бактериурия была выявлена в 27 пробах мочи, по результатам ПЦР-РВ — в 26, т. е. в 96%. При этом в 1 дискордантном образце были выделены *Enterococcus spp.* в количестве 10^5 КОЕ/мл при посевах мочи. При исследовании методом ПЦР-РВ в этой пробе был обнаружен *Enterococcus spp.* в количестве 3×10^5 ГЭ/мл при тестировании «АмплиСенс ИМП-Грам (+)», но при проведении скрининга тестом «АмплиСенс ИМП-скрин» общая бактериальная ДНК была ниже выбранных критериев интерпретации.

Анализ проб мочи с бактериурией, обусловленной возбудителями семейства *Enterobacteriaceae*, показал 100% совпадение результатов. Количество отрицательных проб при бактериологическом исследовании — 541, по результатам ПЦР-РВ значимой бактериурии не обнаружено в 464 пробах мочи.

- *E. coli* (51,8%)
- *Klebsiella spp.* (7,4%)
- *Proteus spp.* (3,7%)
- *S. saprophyticus* (3,7%)
- *Enterococcus spp.* (25,9%)
- *Streptococcus spp.* (11,1%)

Таблица 2

Эффективность выявления возбудителей ИМП

Результат бактериологического исследования (n)		Совпадение результатов ПЦР-РВ и посева	
		n	%
<i>E. coli</i>	41	41	100%
<i>Klebsiella</i> spp.	2	2	100%
<i>Proteus</i> spp.	3	3	100%
<i>Enterococcus</i> spp.	15	15	100%
<i>Streptococcus</i> spp.	7	7	100%
<i>S. saprophyticus</i>	1	1	100%

Таким образом, совпадение результатов ПЦР-РВ и бактериологического метода составило 85,8%, что характеризует специфичность исследуемой методики. Для 77 проб были получены дискордантные результаты, которые могут быть объяснены наличием микрофлоры вагинального биотопа, что подчеркивает необходимость соблюдения правил сбора мочи пациентками.

При сравнении результатов двух методов по идентификации доминирующего микроорганизма в образцах с содержанием бактерий от 10^3 КОЕ/мл получено 100%-е соответствие результатов. Данные представлены в таблице 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новая методика, основанная на ПЦР в реальном времени, для скрининга бактериурии у беременных женщин обладает высокой чувствительностью (96%) и специфичностью (85,9%), достаточной для скринингового теста. Требуется дальнейшее исследование для оценки диагностических характеристик данного метода, что позволит в будущем рекомендовать его в практику лабораторной диагностики ИМП. Преимущество новой методики — быстрота исполнения, что позволяет ускорить принятие клинических решений. Кроме того, данный тест может применяться в учреждениях и лабораториях, которые не располагают условиями для бактериологических исследований, но выполняющих исследования методом ПЦР-РВ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никонов А.П., Асцурова О.Р., Капильный В.А. Инфекции мочевыводящих путей и беременность // Гинекология. — 2007. — Т. 9, № 1.
2. «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)». Приказ Министерства здравоохранения РФ от 01.10.2012 г. № 572 н
3. Шехтман М.М. Руководство по экстрагенитальной патологии у беременных. Практическое пособие. — М.: Триада-Х, 2005. — 816 с.
4. Alwall N., Lohi A. Factors affecting the reliability of screening tests for bacteriuria // I. Acta Med. Scand. — 1973. — Vol. 193. — P. 499–503.
5. Bachman J.W., Heise R.H., Naessens J.M. et al. A study of various tests to detect asymptomatic urinary tract infections in an obstetric population // JAMA. — 1993. — Vol. 270, N 16. — P. 1971–1974.
6. Gilstrap L.C. 3rd, Cunningham F.G., Whalley P.J. Acute pyelonephritis in pregnancy: an anterospective study // Obstet. Gynecol. — 1981. — Vol. 57, N 4. — P. 409–413.
7. Gilstrap L.C., Ramin S.M. Urinary tract infections during pregnancy // Obstet. Gynecol. Clin. North Am. — 2001. — Vol. 28, N3. — P. 581–91.
8. Guidelines on the management of urinary and male genital tract infections. Grabe M. (chairman), Bishop M.C., Bjerklund-Johansen T.E. et al. // European Association of Urology. — 2011.
9. Harris R.E., Gilstrap L.C. 3rd. Cystitis during pregnancy: a distinct clinical entity // Obstet. Gynecol. — 1981. — Vol. 57, N 5. — P. 578–80.
10. Jeyabalan A., Lain K.Y. Anatomic and functional changes of the upper urinary tract during pregnancy // Urol. Clin. North Am. — 2007. — Vol. 34, N 1. — P. 1–6.
11. Kass E.H. Bacteriuria and the diagnosis of infections of the urinary tract // Arch. Intern. Med. — 1957. — Vol. 100, N 5. — P. 709–714.
12. Le J., Briggs F.F., McKeown A. et al. Urinary tract infections during pregnancy // Ann. Pharmacother. — 2004. — Vol. 38, N 10. — P. 1692–701.
13. Lindsay E.N. Managing recurrent urinary tract infections in women // Women's Health. — 2005. — Vol. 1, N 1. — P. 39–50.
14. Millar L.K., Cox S.M. Urinary tract infections complicating pregnancy // Infect Dis. Clin. North Am. — 1997. — Vol. 11, N 1. — P. 13–26.
15. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health. Clinical Guidelines. Antenatal Care. Routine care for the healthy pregnant woman. London: National Institute for Clinical Excellence, 2003.
16. Nicolle L.E. Screening for asymptomatic bacteriuria

- ria in pregnancy // In: Canadian Guide to Clinical and Preventative Health Care. Ottawa: Health Canada, 1994. — P. 100–106.
17. *Nicolle L.E., Bradley S., Colgan R.* et al. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults // Clin. Infect. Dis. — 2005. — Vol.40. — P. 643–654.
 18. *Pfaller M.A., Koontz F.P.* Laboratory evaluation of leukocyte esterase and nitrite tests for the detection of bacteriuria // J. Clin. Microbiol. — 1985. — Vol. 21, N 5. — P. 840–842.
 19. *Romero R., Oyarzun E., Mazor M.* et al. Meta-analysis of the relationship between asymptomatic bacteriuria and preterm delivery / low birth weight // Obstet. Gynecol. — 1989. — Vol. 73, N 4. — P. 576–582.
 20. *Sharma P., Thapa L.* Acute pyelonephritis in pregnancy: a retrospective study // Aust. N Z J. Obstet. Gynaecol. — 2007. — Vol. 47, N 4. — P. 313–315.
 21. *Wing D.A.* Pyelonephritis // Clin. Obstet. Gynecol. — 1998. — Vol. 41, N 3. — P. 515–526.

APPLICATION OF QUANTITATIVE MULTIPLEX REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION FOR IDENTIFICATION OF CAUSATIVE AGENTS OF URINARY TRACT INFECTIONS IN PREGNANCY

Khusnutdinova T.A., Savochkina Yu.A., Shipitsyna Ye.V., Guschin A.E., Savicheva A.M.

◆ **Resume.** Urinary tract infections (UTIs) represent the most common bacterial infections and often complicate pregnancy. UTIs in pregnancy are classified by site of bacterial proliferation as follows: asymptomatic bacteriuria, cystitis, pyelonephritis. Screening for asymptomatic bacteriuria is a standard of obstetrical care and is included in most international guidelines. The urine microbiologic culture is considered the gold standard for laboratory diagnosis of UTIs. Molecular methods enable to rapidly detect, identify and quantitate causative agents of UTIs in urine and are effective alternative to traditional bacteriological methods.

◆ **Key words:** urinary tract infections; asymptomatic bacteriuria; diagnosis.

◆ Информация об авторах

Хуснутдинова Татьяна Алексеевна — научный сотрудник лаборатории микробиологии. ФГБУ «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия д. 3. E-mail: HusnutdinovaT@yandex.ru.

Khusnutdinova Tatyana Alekseyevna — Researcher, Laboratory of Microbiology. D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology RAMS. 3, Mendeleevskaya line, St. Petersburg, 199034, Russia. E-mail: HusnutdinovaT@yandex.ru.

Савочкина Юлия Анатольевна — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии инфекций органов репродукции, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии. ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. 111123, Москва, Новогиреевская ул. д. 3а. E-mail: savochkina@pcr.ru.

Savochkina Yuliya Anatolyevna — PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Reproductive Tract Infections, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology. Central Research Institute of Epidemiology. 3a, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Russia. E-mail: savochkina@pcr.ru.

Гущин Александр Евгеньевич — канд. биол. наук, руководитель лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии инфекций органов репродукции, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии. ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. 111123, Москва, Новогиреевская ул. д. 3а. E-mail: aguschin@pcr.ru.

Guschin Aleksandr Yevgenyevich — PhD, Head of the Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Reproductive Tract Infections, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology. Central Research Institute of Epidemiology. 3a, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Russia. E-mail: aguschin@pcr.ru.

Шипицына Елена Васильевна — д-р биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии. ФГБУ «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия д. 3. E-mail: shipitsyna@inbox.ru.

Shipitsyna Yelena Vasilyevna — PhD, Senior Researcher, Laboratory of Microbiology. D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology RAMS. 3, Mendeleevskaya line, St. Petersburg, 199034, Russia. E-mail: shipitsyna@inbox.ru.

Савичева Алевтина Михайловна — д-р мед. наук, профессор, лаборатория микробиологии. ФГБУ «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия д. 3. E-mail: savitcheva@mail.ru.

Savicheva Alevtina Mikhailovna — MD, PhD, Dr Med Sci, Professor, Laboratory of Microbiology. D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology RAMS. 3, Mendeleevskaya line, St. Petersburg, 199034, Russia. E-mail: savitcheva@mail.ru.