



УДК 617.54-06-08

**Л.Ю. КУЛАГИНА<sup>1</sup>, В.Ю. МАТВЕЕВ<sup>1,2</sup>, И.Р. ВАЛИУЛЛИНА<sup>1</sup>, Р.М. ХАСАНОВ<sup>1,2</sup>, М.Р. МАЗИТОВ<sup>1</sup>, Ю.Н. ДАВИДЮК<sup>3</sup>**<sup>1</sup>Республиканская клиническая больница МЗ РТ, 420064, г. Казань, Оренбургский тракт, д. 138<sup>2</sup>Казанский государственный медицинский университет, 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49<sup>3</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, 420012, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 74

## Использование ПЦР-РВ для определения тактики антибактериальной терапии при гнойно-септических осложнениях у пациентов отделения торакальной хирургии

**Кулагина Людмила Юрьевна** – заведующий отделением клинической фармакологии, научный сотрудник научно-исследовательского центра, тел. (843) 231-63-20, e-mail: kazanfarm@yandex.ru

**Матвеев Валерий Юрьевич** – кандидат медицинских наук, врач-хирург отделения торакальной хирургии, ассистент кафедры хирургических болезней №1, тел. +7-917-286-41-27, e-mail: lavmat@mail.ru

**Валиуллина Инна Робертовна** – заведующий лабораторией клинической бактериологии, врач-высшей категории, тел. (843) 231 21 43, e-mail: innalife@yandex.ru

**Хасанов Расых Мирзазянович** – кандидат медицинских наук, заведующий отделением торакальной хирургии, доцент кафедры хирургических болезней №1, тел. +7-927-423-61-62, e-mail: khasanov.1949@mail.ru

**Мазитов Марат Рафаэлевич** – заместитель главного врача по медицинской части, тел. (843) 231-20-65, e-mail: Marat.Mazitov@tatar.ru

**Давидюк Юрий Николаевич** – кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник OpenLab «Генные и клеточные технологии» ИФМиБ, тел. (843) 293-42-50, e-mail: davi.djuk@mail.ru

*Рассматривается диагностическая значимость методики ПЦР-РВ для определения генов резистентности возбудителей нозокомиальных инфекций. Полученные данные используются для выбора тактики антибактериальной терапии в отделении торакальной хирургии у пациентов с гнойно-септическими осложнениями.*

**Ключевые слова:** гнойно-септические осложнения в торакальной хирургии, эмпиема плевры, ПЦР-РВ, антибактериальная терапия.

**L.Yu. KULAGINA<sup>1</sup>, V.Yu. MATVEEV<sup>1,2</sup>, I.R. VALIULLINA<sup>1</sup>, R.M. KHASANOV<sup>1,2</sup>, M.R. MAZITOV<sup>1</sup>, Yu.N. DAVIDYUK<sup>3</sup>**<sup>1</sup>Republican Clinical Hospital of the MH of RT, 138 Orenburgskiy Trakt, Kazan, Russian Federation, 420064<sup>2</sup>Kazan State Medical University, 49 Butlerov Str., Kazan, Russian Federation, 420012<sup>3</sup>Kazan (Volga Region) Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology, 74 Karl Marx Str., Kazan, Russian Federation, 420012

## The use of RT-PCR to determine the tactics of antibiotic therapy in purulent-septic complications in patients of the Department of Thoracic Surgery

**Kulagina L.Yu.** – Head of Department of Clinical Pharmacology, Researcher of the research and development centre, tel. (843) 231-63-20, e-mail: kazanfarm@yandex.ru

**Matveev V.Yu.** – Cand. Med. Sc., surgeon of the Department of Thoracic Surgery, assistant of the Department of Surgical Diseases №1, tel. +7-917-286-41-27, e-mail: lavmat@mail.ru

**Valiullina I.R.** – Head of laboratory of clinical bacteriology, Physician of Superior Merit, tel. (843) 231 43 21, e-mail: innalife@yandex.ru

**Khasanov R.M.** – Cand. Med. Sc., Head of Department of Thoracic Surgery, Associate Professor of the Department of Surgical Diseases №1, tel. +7-927-423-61-62, e-mail: khasanov.1949@mail.ru

**Mazitov M.R.** – Deputy chief physician for medical parts, tel. (843) 231-20-65, e-mail: Marat.Mazitov@tatar.ru

**Davidyuk Yu.N.** – Cand. Biol. Sc., Associate Professor, Senior Researcher of OpenLab «Gene and Cell Technologies» of the Institute of Fundamental Medicine and Biology, tel. (843) 293-42-50, e-mail: davi.djuk@mail.ru

*In this article is considered the diagnostic importance of the technique RT-PCR to determine the resistance genes of pathogens of nosocomial infections. The data obtained are used to select the tactics of antibacterial therapy in the Department of Thoracic Surgery in patients with purulent-septic complications.*

**Key words:** *purulent-septic complications in thoracic surgery, pleural empyema, RT-PCR, antibacterial therapy.*

Наиболее сложным разделом торакальной хирургии является диагностика и лечение гнойно-деструктивных заболеваний легких и плевры и часто сопровождающих их системных и местных гнойно-септических осложнений. В настоящее время сохраняется тенденция роста количества больных с острыми гнойно-деструктивными заболеваниями легких и плевры, осложненных эмпиемой плевры. Так, эмпиема плевры, развивается у 10-40% больных с острыми абсцессами легкого и у 20-80% больных с гангреной легочной ткани. Процент перехода острой эмпиемы плевры в хроническую по-прежнему высок и составляет, по данным разных авторов, от 10 до 50%. Своевременная диагностика и лечение острой эмпиемы плевры в 60-70% случаев предупреждает переход в хроническую, при этом летальность составляет 7,2-28,3% [1-3, 9, 11].

Лечение больных с эмпиемой плевры до сих пор представляет собой сложную проблему, о чем свидетельствуют относительно высокие показатели длительности госпитализации, частоты осложнений, летальности, хронизации процесса, инвалидизации больных, большинство из которых лица трудоспособного возраста [5, 6]. Это связано с изменением видового состава микрофлоры и ее толерантности ко многим антибактериальным препаратам, увеличение доли анаэробной и госпитальной инфекции, широким нерациональным использованием антибиотиков, бытовой аллергией, неблагоприятными социальными факторами, возрастанием числа лиц с вторичными иммунодефицитами различного происхождения [4, 8, 12].

Однако повышенный интерес к данной проблеме связан не только с большой частотой случаев заболевания, но и особым характером течения патологического процесса. Кроме того, оперативные методы лечения часто сопровождаются осложнениями, травматичны и не всегда выполнимы из-за тяжелого состояния пациентов [4, 6, 11].

Наряду с хирургическими методами лечения, актуальным является вопрос о назначении эффективных антибактериальных препаратов. Проблема рациональной антибактериальной терапии в стационаре широко обсуждается мировой медицинской общественностью. Не вызывает сомнений, что выбор терапии строится на данных об основных возбудителях инфекционных заболеваний и уровне их резистентности как в стационаре, так и в конкретном отделении.

Определение предпочтительных антибиотиков для лечения больных гнойно-септическими инфекциями обычно ведется диско-диффузионным методом, в основе которого лежит выделение из патологического материала этиологического агента и определение зоны задержки роста бактерий при посеве на агар в присутствии бумажных дисков, пропитанных разными антибиотиками [13].

Современная медицина успешно использует достижения естественных наук, интенсивно применяет новые технологии для диагностики и лечения заболеваний. В последнее время к традиционным микробиологическим и иммунологическим методам лабораторной диагностики инфекционных заболе-

ваний добавились новые, основанные на использовании молекулярно-генетических технологий. Применение этих методов не только в научных целях, но и в практической лабораторной диагностике стало возможным в немалой степени благодаря созданию в середине 80-х годов процесса искусственно-многократного копирования ДНК и дальнейшему стремительному развитию этой технологии, в настоящее время известной как *полимеразная цепная реакция* (ПЦР).

Весь процесс ПЦР-анализа — от момента поступления образца в лабораторию до получения конечного результата — занимает обычно не более одного рабочего дня. Преимущество ПЦР в скорости по сравнению с культуральными методами особенно заметно при исследовании медленнорастущих микроорганизмов. Однако даже в случае быстрорастущих культур оперативность ПЦР может быть полезной [14].

В молекулярной биологии ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) или так называемая количественная ПЦР в реальном времени используется как лабораторная техника на основе реакции ПЦР для амплификации и, одновременно, количественной оценки таргетированной молекулы ДНК. Это позволяет регистрировать и количественно оценивать конкретную последовательность в образце ДНК [15].

**Цель исследования** — оценка эффективности использования методики ПЦР-РВ для выбора тактики антибактериальной терапии у больных с гнойно-деструктивными заболеваниями легких и плевры при выделении резистентных возбудителей.

#### **Материал и методы исследования**

Фенотипическое выявление резистентных штаммов проводилось диско-диффузионным методом на среде Мюллер-Хинтон (Oxoid, Англия), с использованием дисков (Oxoid, Англия). Оценка чувствительности проводилась по рекомендациям CLSI 2014. Полученные данные коррелировали с клинической неэффективностью стартовой антибактериальной терапии у пациентов отделения торакальной хирургии.

При определении резистентности, штамм дополнительно исследовался на наличие генов методом ПЦР-РВ. Для выделения ДНК из клеточных культур использовался реагент «ДНК-экспресс» (Литех, РФ). Определение генов резистентности методом ПЦР-РВ проводилось с использованием наборов реактивов формата «ФЛУОРОПОЛ-РВ» комплектации «Нераскапанный» (Литех, РФ) и амплификатора «CFX-96» (BioRad, США). Анализ результатов амплификации проводился с помощью программы BioRad CFX Manager 3.0, согласно «Руководству по применению наборов формата ФЛУОРОПОЛ-РВ».

#### **Обсуждение полученных результатов**

Проанализированы основные возбудители инфекционно-воспалительных заболеваний, которые в дальнейшем исследованы на гены резистентности: 46 штаммов за 4 месяца 2014 года и 114 штаммов в 2015 году (табл. 1).



**Таблица 1.**  
**Структура основных возбудителей гнойно-септических осложнений**

	Enterobacteriaceae		Всего	НГОБ		Всего	Итого
	Kl.pneumoniae	Прочие		Ps.aeruginosae	Acinetobacter spp.		
2014	35%	24%	59%	26%	15%	41%	100%
2015	41%	4%	45%	23%	32%	55%	100%

**Таблица 2.**  
**Результаты молекулярно-генетического типирования**

Годы	2014			2015			
	Гены	OXA-48	CTX-M	VIM	OXA-48	CTX-M	VIM
Enterobacteriaceae		74%	92%	2%	71%	82%	0
Ps.aeruginosae		-	-	50%	-	-	50%

В структуре нозокомиальных возбудителей преобладает семейство Enterobacteriaceae, продуцирующих БЛРС и представленных преимущественно Kl.pneumoniae. Необходимо отметить, что в 2014 году 20% исследуемых штаммов составлял род Serratia spp., тогда как в 2015 году его доля составила 1%. Другие возбудители, входящие в раздел «Прочие», составляли в равных пропорциях E.coli и Enterobacter spp.

Доля неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ) увеличилась с 41% в 2014 году до 54% в 2015 году за счет увеличения Acinetobacter spp. с 15 до 32%.

Ввиду того, что для Acinetobacter spp. определяли только гены VIM и NDM, развернутый анализ данной культуры оказался невозможен из-за отсутствия тестов на OXA-40, OXA-23 и OXA-58.

Проанализированы данные молекулярно-генетического типирования резистентных штаммов отделения торакальной хирургии за 2014-2015 гг. (табл. 2).

В структуре резистентных возбудителей лидирует Kl.pneumonia, содержащая гены резистентности CTX-M и/или OXA-48. Терапия инфекционно-воспалительных заболеваний, вызванных данными штаммами, включает в себя цефоперазон/сульбактам, карбапенемы, аминогликозиды, при тяжелом течении заболевания применялась комбинация препаратов.

Однако в динамике за два года просматривается смещение акцента проблемности для выбора антибактериальной терапии с Kl.pneumonia на

Acinetobacter spp. Учитывая рост нозокомиальных инфекций, вызванных мультирезистентными штаммами Acinetobacter spp. и ввиду отсутствия возможности определять гены резистентности данной культуры, даже при наличии результатов диско-диффузионного метода, антибактериальная терапия носит преимущественно эмпирический характер и представляет большие трудности.

### Заключение

На основании полученных данных выявленная ситуация диктует необходимость:

- Расширения спектра изучаемых генов резистентности, характерных для Acinetobacter spp.;
- Проведения скрининга всех клинических штаммов Acinetobacter spp. на металло-бета-лактамазы и приобретенные OXA-карбапенемазы до определения чувствительности к антибиотикам;
- Включить разработанную технологию ПЦР в алгоритм исследований Acinetobacter spp. в микробиологической лаборатории;
- Рассматривать имипенем, дорипенем, меропенем и цефоперазон/сульбактам в качестве препаратов эмпирической и этиотропной терапии нозокомиальных инфекций, вызванных Acinetobacter spp.

Таким образом, возможность использования на ранних этапах методики ПЦР-РВ у пациентов с тяжелыми гнойно-септическими осложнениями позволяет быстро определять механизмы антибиотикорезистентности проблемных бактерий и своевременно назначать эффективную антибактериальную терапию.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Гостищев В.К. Активная этапная хирургическая санация при гнойных заболеваниях легких и плевры / В.К. Гостищев, В.П. Сажин, А.Я. Коровин и др. // Методические рекомендации. — Рязань, 1996. — 35 с.
2. Бодня В.Н. Видеоторакоскопическое лечение хронической эмпиемы плевры / В.Н. Бодня: автореферат дис. ... канд. мед. наук. — Кубанская государственная медицинская академия, 2001. — 108 с.
3. Кабанов А.Н., Ситко Л.А. Лечение эмпиемы плевры // Грудная хирургия. — 1985. — №4. — С. 27-31.
4. Лищенко В.В. Острые гнойно-деструктивные заболевания легких // В кн.: Частная хирургия. — 1998. — Т. 1. — С. 164-184.
5. Цеймах Е.И. Лечение острых эмпием плевры и пиопневмоторакса // Грудн. и сердечн.-сосудистая хирургия. — 1999. — №1. — С. 51-54.
6. Шойхет Я.Н., Цеймах Е.А. Лечение острых эмпием плевры. — Барнаул, 1996. — 240 с.
7. Aguilar M.M., Battistella F.D., Owings J.T., Su T. Posttraumatic empyema. Risk factor analysis // Arch. Surg. — 1997. — №6. — P. 647-650.

8. Bartlett J.B. Anaerobic bacterial infection of the lung and pleural space // Clin. Infect. Dis. — 1993. — Vol. 16, S4. — P. 248-255.
9. Lema L., Hutter J.A., Harari D. et al. The management of empyema thoracis by thoracoscopy and irrigation // Cent. Afr. J. Med. — 1990. — №1. — P. 20-22.
10. Le Mense G.P., Strange C., Sahn S.A. Empyema thoracis. Therapeutic management and outcome // Chest. — 1995. — №5. — P. 1532-1537.
11. Toomes H., Vogt-Moykopt U., Ahrendt J. Decortication der Lung aus funktionelles // Sicht. Prax. Klin. Pneumol. — 1993. — Vol. 37. — P. 335-398.
12. Hamm H., Light R.W. Parapneumonic effusion and empyema // Eur. Respir. J. — 1997. — №5. — P. 1150-1156.
13. МУК 4.2.1890-04.
14. Лопухов Л.В., Эйдельштейн М.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике // КМАХ. — 2000 — Т. 2, №3. — С. 96-106.
15. Верслегерс Й. (Нид), Колесниченко А. (Нид), Хаддемант Т. (Нид), Страуккен Л. (Нид), Де Йонг М. (Нид), Де Врис Й. (Нид). <http://www.findpatent.ru/patent/254/2548606.html>