

**БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ СЛУЖБА НИИ ДЕТСКИХ ИНФЕКЦИЙ
ФМБА РОССИИ: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАУКИ И ПРАКТИКИ
В ПРОШЛОМ И НАСТОЯЩЕМ
(к 85-летию Научно-исследовательского института детских инфекций)**

Ю.В. Лобзин, А.С. Кветная, С.В. Сидоренко, И.Г. Самойлова

*ФГУ "Научно-исследовательский институт детских инфекций ФМБА России",
Санкт-Петербург*

В статье представлена эволюция развития бактериологической службы НИИ детских инфекций в течение 50 лет. Определено практическое значение взаимодействия науки и практики на всех этапах развития службы.

Ключевые слова: дети, методы, диагностика, инфекции

**BACTERIOLOGICAL SERVICE OF RESEARCH INSTITUTE OF CHILDREN'S
INFECTIONS FMBA OF RUSSIA: SCIENCE AND PRACTICE INTERACTION
IN THE PAST AND PRESENT**

Lobzin Y.V., Kvetnaya A.S., Sidorenko S.V., Samoylova I.G.

The article presents the evolution of development of bacteriological service of research institute of children's infections within 50 years. Practical value of science and practice interaction at all stages of development of service is defined.

Key words: children, methods, diagnostics, infections

Введение

Бактериологическая служба Научно-исследовательского института детских инфекций ведет свою историю 50 лет – с 1961 года после реорганизации Научно-исследовательского педиатрического института в первый в мире и единственный в СССР Научно-исследовательский институт детских инфекций. Первым руководителем бактериологической лаборатории до 1964 года была высококвалифицированный врач-бактериолог А.В. Левина (фото1). Бактериологическая лаборатория в этот период обеспечивала проведение только диагностических исследований.

С 1964 г. бактериологической лабораторией, а в последующем – иммуно-бактериологическим отделом на протяжении 15 лет (до 1979 г.) руководил видный ученый-микробиолог, д.м.н., профессор В.Н. Чернова (фото 2).

С первых лет существования отдел, возглавляемый профессором В.Н. Черновой, приобрел все черты самостоятельного научного отдела института. Деятельность отдела отличалась интенсивным развитием научных исследова-



Фото 1. Левина А.В. – первый руководитель бактериологической лаборатории НИИ детских инфекций (1961-1964 гг.).



Фото 2. Чернова В.Н. – руководитель иммуно-бактериологического отдела НИИ детских инфекций (1964 - 1979 гг.)

ний, посвященных изучению патогенеза бактериальных гнойных менингитов (БГМ), эшерихиозов и биологических особенностей ЭПКП (энтеропатогенных кишечных палочек), выявлению механизмов антибиотикорезистентности возбудителей бактериальных инфекций у детей.

В 60- годы прошлого столетия складывается научная школа под влиянием идей профессора В.Н. Черновой. Под ее руководством успешно защищены кандидатские диссертации Г.С. Кашкиным, В.С. Авраменко, Н.В. Иокимовой, Н.А. Коржуевой, В.Ф. Цинзерлинг и др. (фото 3).

С 1979 г. по 1985 г. бактериологической группой института руководит к.м.н. В.С. Авраменко – ученик профессора В.Н. Черновой, верный последователь научных идей своего учителя (фото 4). В этот период особое внимание уделяется созданию экспериментальных моделей мо-



Фото 3. Коллектив иммуно-бактериологического отдела НИИ детских инфекций (1964 - 1979 гг.).



Фото 4. Авраменко В.С. – руководитель бактериологической группы НИИ детских инфекций (1979 - 1985 гг.).

но- и смешанных вирусно-бактериальных и бактериально-бактериальных инфекций [1].

После ухода из института В.С. Авраменко бактериологической лабораторией с 1985 г. и по настоящее время руководит д.м.н., профессор А.С. Кветная – ученица выдающихся ученых-микробиологов – академика РАМН, профессора С.В. Прозоровского, профессоров Г.Н. Чистовича и Н.Н. Костюковой (фото 5).

Многолетние исследования, развиваемые учеными бактериологической группы института, были посвящены изучению этиопатогенеза бактериальных инфекций у детей, в контексте с выяснением причинно-следственных связей, определяющих характер развития инфекционного процесса. Идеологом данного направления была директор института, член-корр. РАМН,



Фото 5. Кветная А.С. – руководитель отдела микробиологии человека НИИ детских инфекций с 1985 г.

д.м.н., профессор В.В. Иванова. Итогом успешного развития данного направления стали результаты, подтверждающие общебиологическую концепцию о взаимообуславливающем характере отношений между микро- и макроорганизмом в системе «паразит-хозяин» [2].

На примере изучения бактериальных инфекций (БГМ, ОКИ, дифтерии, коклюша, кампилобактериоза и пневмоний, осложняющих течение ОРВИ) у детей установлен различный (однонаправленный или разнонаправленный) характер выраженности факторов патогенности возбудителя – у штаммов, выделенных на разных сроках развития инфекционного процесса, изолятов, выделенных от больных, бактерионосителей, привитых и непривитых АКДС-вакциной. На клиническом материале научно обосновано положение, что инфекционный процесс, будучи многофакторным, не сводится лишь к взаимодействиям между возбудителем и макроорганизмом, взятым в общем «чистом» виде. Установлено, что отношения этих активно взаимодействующих (макро- и микроорганизма) в системе «паразит-хозяин» трансформируются в развитие целого каскада адаптационно-регуляторных механизмов, регистрируемых на всех пяти стадиях инфекционного процесса. При этом было доказано, что развитие инфекционного процесса уже на первом этапе подчиняется собственным закономерностям и представляет собой вполне самостоятельный акт, определяющий дальнейший исход взаимоотношений возбудителя с макроорганизмом. Полученные результаты, а также положения и концепции последних лет об адаптационно-регуляторных механизмах взаимодействия в системе «паразит-хозяин» явились научным обоснованием разработанного алгоритма оценки резистентности слизистых оболочек в прогнозировании исходов инфекционной патологии у детей [3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11].

Проведение алгоритма оценки резистентности слизистых оболочек в прогнозировании исходов инфекционного процесса при ОКИ у детей позволило установить, что в основе развития глубоких микробиологических нарушений слизистой толстой кишки (декомпенсированных форм дисбактериоза II-III степени) и утяжеления инфекционного процесса в первые три дня заболевания заложены экспрессия ведущих факторов патогенности возбудителя и характер его взаимодействия с эпителиоцитом,

на 7-10 день болезни – гено-фенотипические особенности определенных представителей группы условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*). Высокие уровни колонизационных и персистентных характеристик возбудителя и УПМ (гидрофобность 0,4-0,6 мл; СПА (средний показатель адгезивности) > 8; ДНК-аза $\geq 2,1$ мм; АЛА ≥ 11 мкг; наличие лизоцимного фермента), низкий уровень ($\leq 1,8$ Ig) неспецифического секреторного Ig класса А в копрофильtrate и функциональная активность полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ) с индексом ≥ 1 – определены как критерии развития глубоких микробиологических нарушений слизистой толстой кишки и затяжного течения ОКИ. [10,12].

Интегральная оценка морфофункциональных характеристик слизистой дыхательных путей при ОРВИ: деструктивные изменения слизистой, формирование на слизистой новых рецепторных возможностей для колонизационной активности этиологически значимых микроорганизмов – как результат модификации вирусами мембран эпителиоцитов, низкий уровень местного неспецифического секреторного иммуноглобулина А и состояние фагоцитоза ПЯЛ – позволила прогнозировать исход вирусно-бактериального процесса в бронхо-легочной системе при ОРВИ. Выявлено два варианта вирусно-бактериального поражения легких при гриппе и других ОРВИ у детей. Первый вариант характеризуется наслоением моно-пневмококковой инфекции на вирусную в первые три дня болезни, при втором варианте – на вирусную инфекцию первично наслаивается пневмококковая, вторично – другая бактериальная инфекция, обусловленная преимущественно грамотрицательной флорой, в том числе *Klebsiella pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* [3].

Оценка состояния эпителиоцитов слизистой ротоглотки (наличие или деструкция эпителиоцитов), регистрация большого количества нитей фибрина и обнаружение экзотоксина иммуноцитохимическим методом на эпителиоцитах при высокой колонизации *C. diphtheriae* (*Corynebacterium diphtheriae*) и других УПМ позволили установить критерии формирования тяжелой формы бактерионосительства токсигенных дифтерийных палочек. Отсутствие деструктивных процессов на слизистой ротоглотки, высокая степень колонизации

C. diphtheriae, наличие полинуклеаров с фагоцитарной активностью по отношению этиологически значимому микроорганизму, например к *S.pyogenes*, являлись критериями для подтверждения диагноза «ангина + бактерионосительство токсигенных дифтерийных палочек» [13]. Установлено, что состояние антиинфекционной резистентности слизистой ротоглотки (состояние микробиоценоза, высокие показатели ЭЛА (электрокинетической активности) ядер буккального эпителия и высокий уровень местного неспецифического секреторного иммуноглобулина А (SIgA) определяет благоприятный исход течения дифтерии или формирование кратковременного бактерионосительства токсигенных дифтерийных палочек. В то же время, декомпенсированные формы дисбактериоза слизистой ротоглотки, низкий уровень местного неспецифического SIgA и низкие показатели ЭЛА играют ключевую роль в формировании затяжных форм дифтерийного бактерионосительства. На клиническом и экспериментальном материале доказано, что длительная персистенция токсигенных дифтерийных палочек на слизистой ротоглотки у детей при бактерионосительстве – результат не только антагонистического действия возбудителя (и его ассоциацией с УПМ) по отношению к резидентной микрофлоре, но и синергидного взаимодействия токсигенных дифтерийных палочек с определенными представителями УПМ [4, 6, 13].

Наряду с изучением этиопатогенетических особенностей бактериальных инфекций у детей, сотрудниками бактериологической группы более 20 лет велись разработки и успешно внедрялись доступные диагностические тесты, обеспечивающие экспрессную этиологическую диагностику на основе РАЛ (реакции агглютинации латекса), иммуноферментного анализа (ИФА) и реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ), а также научно-обоснованной системы проведения этиологического диагноза моно- и смешанных бактериальных инфекций у детей. Методологическая основа вышеупомянутых разработок изложена в полученных патентах (5), во фрагментах или главах изданных монографий (2), методических рекомендациях (4), учебных пособиях для врачей (4), информационных письмах, опубликована в статьях (22) и тезисах (55) [14-20].

Так, разработанный в институте способ экспресс-индикации дифтерийного токсина в

сыворотке крови больных дифтерией на основе РАЛ обеспечивал постановку раннего этиологического диагноза дифтерии через 10-20 мин с момента обследования больного. Этот метод, получивший статус «патента», в период эпидемического подъема дифтерии в Санкт-Петербурге (1994 - 1998 гг.) оказался методом выбора. Из общего числа (более 4 тыс) госпитализированных в клинику института детей, больных дифтерией, диагноз подтверждался в 86-100% случаев. Для экстренного решения вопроса о введении адекватных доз противодифтерийной сыворотки пациенту с подозрением на дифтерию также успешно использовался разработанный высокочувствительный экспресс-метод выявления токсина на эпителиоцитах, основанный на реакции энзим-меченных антител. Метод позволял выявить даже незначительное количество дифтерийного токсина, адсорбированного на мембранах эпителиоцита, чувствительных к его действию клеток. Метод был эффективен при всех формах дифтерии и обеспечивал проведение ранней дифференциальной диагностики дифтерии с мононуклеозом и бактериальными ангинами. Преимуществом предлагаемого метода – экспрессного выявления дифтерийного токсина непосредственно на эпителиоцитах ротоглотки, являлись его неинвазивность и возможность получить объективное представление о резистентности слизистой ротоглотки. Благодаря предлагаемому методу увеличился процент подтвержденных случаев при локализованных формах дифтерии (с 90,4 до 100% и распространенных формах – с 76,1 до 100% случаев [21].

Частота регистрации коклюша (как среди непривитых, так и среди привитых), многообразие клинических форм заболевания, появление «диких» штаммов возбудителя, низкий процент бактериологического подтверждения клинического диагноза обосновали необходимость разработки метода ранней этиологической диагностики, основанного на выявлении корпускулярных антигенов *B. pertussis* и местного специфического секреторного иммуноглобулина А в гортанно-глоточных смывах и браш-биоптатах с использованием метода непрямой иммунофлюоресценции. Метод апробирован на большом клиническом материале, обследовано более 10 тысяч пациентов с подозрением на коклюш.

Разработанный в институте мониторинг уг-

лубленного изучения гено-фенотипического профиля антибиотикорезистентных штаммов шигелл Флекснера позволил охарактеризовать региональные особенности циркулирующих «эпидемических» клонов в Санкт-Петербурге и установить прямую коррелятивную связь между наличием «тяжелой» плазмиды (140 mD), ДНК-азной, гемолитической активностью клинических изолятов шигелл и характером течения инфекционного процесса, что явилось идеологической основой для подтверждения гипотезы об активном однонаправленном и координированном характере взаимодействия хромосом и плазмид в бактериальной клетке с множественной ассоциированной устойчивостью, а также для создания научно обоснованной стратегии рациональной этиотропной терапии не только тяжелых форм дизентерии Флекснера, но и затяжных и рецидивирующих форм пневмококковых менингитов и отитов, обусловленных L-формами и толерантными к пенициллину штаммами возбудителя, гемофильной инфекции с затяжным течением, вызванных антибиотикорезистентными штаммами возбудителей с бета-лактамазной и хлорамфениколацетилтрансферазной активностью [5, 7].

Многолетний микробиологический мониторинг основных возбудителей бактериальных гнойных менингитов у детей в Санкт-Петербурге позволил установить доминирующую роль менингококка (50-70%), гемофильной палочки типа "b" (17,1-37,2%) и пневмококка (7,1-22,9%) в структуре бактериальных гнойных менингитов. [22,23]. Впервые в Санкт-Петербурге установлена циркуляция резистентных к ампициллину с (β -лактамазной активностью) штаммов гемофильной палочки типа "b" (Hib), обусловивших подъем заболеваемости БГМ среди детей в 1997-1998 гг.

Наряду с изучением штаммовых особенностей традиционных возбудителей бактериальных инфекций у детей, решалась задача изучения группы УПМ с учетом их многообразия и этиологической значимости при ОКИ и пневмониях, осложняющих течение ОРВИ. Данное направление получило развитие благодаря экологическому подходу в решении этой проблемы, в основе которого – выяснение причинно-следственных связей развития дисбиотических нарушений микробиоценоза слизистых и патологического процесса на начальном этапе заболевания. Итогом развития данного на-

правления явились научно-обоснованные границы количественной и качественной оценки микроорганизмов при бактериальных инфекциях у детей в различных биотопах: слизистых ротоглотки (при дифтерии, коклюше и мононуклеозе) и просвета толстой кишки (при ОКИ). Полученные результаты легли в основу разработки информативных критериев прогноза характера течения инфекционного процесса.

Бактериологическая группа института принимала активное участие в реализации совместной Российско-Финляндской программы на 2001-2003 гг. «Надзор за инвазивными бактериальными инфекциями в Санкт-Петербурге».

Эта работа впервые позволила достоверно определить заболеваемость до 5 лет Hib-инвазивными инфекциями, которая составила в Санкт-Петербурге 18,1 на 100 тыс. детей (в т.ч. у детей до 2-х лет – 23,7 на 100 тыс.). Полученные результаты свидетельствуют, что в Санкт-Петербурге показатели заболеваемости Hib-инфекцией в настоящее время практически аналогичны показателям Hib-инфекции в большинстве европейских стран (порядка 10-25 случаев на 100 тыс. в аналогичной популяции) и в странах американского континента (порядка 20-50 случаев на 100 тыс.) до введения вакцинопрофилактики.

В успешном развитии и проведении научных разработок в эти годы активно участвовали аспиранты, научные сотрудники лаборатории и клиник института, а также высококвалифицированные врачи и лаборанты бактериологической лаборатории (Н.А. Коржуева, Г.С. Кашкин, М.О. Волкова, Т.Б. Корженевская, Д. Хусейн, Е.В. Таликова, И.А. Мартынова, Д.С. Быщенко, Л.И. Железова, О.С. Калиногорская, И.В. Партина, Л.Н. Лачкова, Н.И. Додонова, Н.Г. Лоскутова, М.Л. Жидкова, О.А. Сосунова, Ю.В. Харитоновна, Т.М. Явиц и А.К. Смирнова) (фото 6).

Новый этап в развитии бактериологической службы связан с приходом (2008 г.) директора института – заслуженного деятеля науки РФ, академика РАМН, д.м.н., профессора Юрия Владимировича Лобзина, реорганизацией бактериологической группы в отдел микрoэкологии человека (руководитель – д.м.н., профессор А.С. Кветная), а также созданием отдела молекулярной микробиологии и эпидемиологии (руководитель – д.м.н., профессор С.В. Сидоренко) (фото 7).

В настоящее время стратегия и тактика научной деятельности отдела направлены на раз-



Фото 6. Коллектив отдела микробиологии человека НИИ детских инфекций (2011 г.)



Фото 7. Сидоренко С.В. – руководитель отдела молекулярной микробиологии и эпидемиологии НИИ детских инфекций

витие наиболее приоритетных исследований, связанных с изменениями жизни людей, обусловленными научно-техническим прогрессом, широким применением антибиотиков и иммунодепрессантов, а также ухудшением социальных условий и экологической обстановки. Перечисленные факторы привели к расширению и изменению этиологической структуры инфекционных заболеваний, смещению удельного веса «традиционных» патогенных возбудителей в сторону резидентной, УПМ, микоплазм, хламидий, кампилобактеров и анаэробов в развитии инфекционной патологии, широкому распространению лекарственно-устойчивых форм и атипичных штаммов возбудителей. В связи с этим, особенностью выполняемых в настоящее время научных работ является решение задач, обусловленных социально-экономической значимостью заболеваний у детей с врожденными инфекциями, с поражением дыхательных путей бактериальной природы у часто и длительно болеющих и со смешанными формами инфекции, в частности, сальмо-

неллеза, ассоциированного с лямблиозом, и пневмококковой пневмонии, ассоциированной с хламидиозом. О приоритетности развиваемых научных направлений в настоящий период свидетельствуют полученные диплом и сертификат в конкурсах «Лучшие инновационные проекты в сфере науки и высшего профессионального образования СПб 2008 и 2010 гг.», а также выполнение научных работ при поддержке 4-х грантов Правительства СПб. Результаты проведенных исследований, посвященных изучению этиопатогенетических особенностей сочетанных форм сальмонеллезной инфекции с протозойной инвазией у детей, отмечены I местом в Конкурсе молодых ученых в рамках VIII Конгресса детских инфекционистов России (Москва, 2009 г.).

В настоящее время лаборатории института оснащены современным оборудованием ведущих мировых компаний ("Biomerieux" и "Paster Merio", Франция; "Bruker" и "Carl Zeiss", Германия) и имеют современную ПЦР-лабораторию, позволяющую выполнять диагностические и научные исследования на уровне мировых стандартов качества и достичь оптимальных сроков получения ответа [24, 25, 26].

Постановка этиологического диагноза у пациентов с септициемией различной этиологии, тяжелыми формами пневмоний с бактериемией, менингитом и длительной лихорадкой неясного генеза осуществляется на автоматическом анализаторе "VacT/ALERT 3D", позволяющем, в отличие от классического метода исследования крови на гемокультуру, установить бактериемию даже на фоне интенсивной антибактериальной терапии (за счет сорбента антибиотиков в питательной среде) уже через 5 час при наличии в исследуемой пробе крови даже 1 микробной клетки. Из 367 проб крови пациентов, полученных на фоне антибактериальной терапии, в 63 пробах в первые 5 час инкубации выделены культуры этиологически значимых микроорганизмов: *Neisseria meningitidis* серогрупп А, В и С, *Haemophilus influenzae* типа "b", *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*, а также грибы из рода *Candida*. Параллельно проведенные посеvy проб крови на гемокультуру классическим методом в 1% сахарный бульон не дали положительных результатов.

На анализаторе "VIDAS" (в течение 1 час) в пробах фекалий успешно осуществляются

экспресс-индикация экзотоксина *Clostridium difficile* A&B. В основу исследования положен метод фермент-связанного флуоресцентного анализа. Из 63 проб фекалий, полученных от пациентов с дисбактериозом, в 11 случаях выявлен экзотоксин *Clostridium difficile* A&B.

Кроме того, на анализаторе "VIDAS" (в течение 15 мин) с целью диагностики степени риска развития тяжелого сепсиса и септического шока у тяжело больных детей отделения реанимации в день поступления и в динамике заболевания осуществляется количественное определение в сыворотке или плазме крови прокальцитонина – PCT (от 0,1 до 500 нг/мл).

При проведении исследований на дисбактериоз различных биотопов и диагностике бактериальных инфекций, обусловленных УПМ, широко используется автоматический анализатор "ВИТЕК 2", предназначенный для идентификации (в течение 5-18 час) бактерий (более 300 видов), грибов и определения чувствительности к антибиотикам методом серийных разведений. В результате, число микроорганизмов в общей этиологической структуре ОКИ, пневмоний и госпитальных инфекций увеличилось в 3 раза за счет увеличения диапазона идентифицируемых видов.

Достижения молекулярной биологии, давшие мощный импульс к развитию современной медицины, не обошли и медицинскую микробиологию. При этом следует отметить, что практические задачи микробиологии оказались одним из первых стимулов к развитию молекулярной биологии. В 1928 г. в экспериментах с пневмококками при попытках разработать вакцину Фредерик Гриффит впервые обнаружил, что такое свойство бактерий как вирулентность можно передать от одного штамма другому с помощью некой химической субстанции (трансформирующего агента). В 1944 г. трансформирующий агент был идентифицирован Освальдом Эвери и коллегами как ДНК.

Важнейшими этапами внедрения достижений молекулярной биологии в практику было изобретение в начале 80-х годов XX века Кэри Муллисом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и работы по определению нуклеотидных последовательностей геномов живых существ, начатые в 1990 г. в рамках проекта «Геном человека» (The Human Genome Project, HGP). Первым расшифрованным бактериальным геномом был геном *Haemophilus influenzae* (1995). К настоящему моменту определены ге-

номы более 800 штаммов, принадлежащих более чем 300 видам бактерий.

Следующей практически важной задачей является оценка разнообразия бактерий на Земле – как в целом, так и в организме человека, в частности. Для решения последней задачи сформирован Международный консорциум по микробиому человека (The International Human Microbiome Consortium), финансируемый странами Северной Америки и Европейского Союза. Уже первые результаты этих работ дали впечатляющие результаты. В рамках реализации финансируемого Евросоюзом проекта MetaHIT (Metagenomics of human intestinal tract), установлено, что в человеческой популяции, независимо от расовой принадлежности, пола, характера питания и других факторов можно выделить три устойчивых варианта видового состава микробиома кишечника, получивших название энтеротипов [27]. Вполне возможно, что накопление данных о микробиоме человека приведут к пересмотру представлений о целесообразности и путях коррекции микрофлоры человека.

Естественно, что в повседневную практику микробиологических лабораторий вошли еще далеко не все достижения фундаментальных дисциплин и технологические новинки. Тем не менее, современная микробиологическая лаборатория уже значительно отличается от традиционной.

Развитие медицинской микробиологии идет по следующим направлениям:

- внедрение не связанных с культивированием методов детекции возбудителей инфекционных болезней;
- совершенствование методов культивирования и идентификации бактерий;
- автоматизация отдельных этапов микробиологических исследований.

Методы детекции патогенов, не связанные с культивированием, основаны на применении ПЦР или реже – гибридизации. Сама технология проведения ПЦР постоянно развивается. Появились методы проведения ПЦР в реальном времени, а также изотермические методы, не требующие циклического изменения температуры проведения реакции (NASBA – Nucleic Acids Sequence-Based Amplification; TMA – transcription mediated amplification). Шире всего распространены методы амплификации генов-мишеней, специфичных для отдельных ви-

дов микроорганизмов. Внедрение этих методов началось с детекции вирусов и трудно культивируемых бактерий, прежде всего, возбудителей инфекций, передаваемых половым путем: *Neisseria gonorrhoeae* и *Chlamydia trachomatis*. В последние годы появилась целая серия коммерческих продуктов (SeptiFast, Roche; VYOO, SIRSLab; Prove-it™ Sepsis, Mobidiag), основанных на различных модификациях ПЦР и предназначенных для детекции в крови и других стерильных жидкостях наиболее распространенных возбудителей тяжелых инфекции и сепсиса (представителей семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* и других). Указанные системы позволяют диагностировать бактериемии в течение рабочего дня, что существенно повышает возможности своевременного назначения адекватной антибактериальной терапии [28]. Крайне важным компонентом перечисленных систем являются патентованные наборы реактивов для концентрации бактериальной ДНК и избавления от эукариотической ДНК. Некоторые из указанных систем рассчитаны также на детекцию наиболее актуальных генов антибактериальной резистентности, но, в целом, молекулярные методы, на сегодняшний день не позволяют адекватно оценивать антибиотикорезистентность бактерий.

Принципиальным недостатком молекулярных методов является невозможность выявить новые механизмы антибактериальной резистентности, скорость формирования которых в последнее время резко возросла. Кроме того, выявление у микроорганизма детерминанты устойчивости к антибиотику не прогнозирует его клиническую неэффективность. Во многих случаях концентрации антибактериальных препаратов, создающиеся в очаге инфекции, позволяют преодолевать резистентность.

Очевидно, что диагностические системы, основанные на приведенных выше принципах, не способны детектировать весь спектр возможных патогенов. Для решения этой задачи применяются подходы, основанные на анализе генов, кодирующих рибосомальные РНК, прежде всего – 16S рРНК [29]. Указанные гены включают как высококонсервативные участки, идентичные у всех известных бактерий, так и уникальные, характерные для отдельных видов бактерий. На первом этапе исследования, используя так называемые универсальные праймеры, комплементарные консервативным

участкам генов 16S рРНК, фланкирующим варибельные участки, в ПЦР возможно амплифицировать и детектировать ДНК любого микроорганизма, содержащегося в исследуемом биологическом образце. На втором этапе необходимо определить нуклеотидную последовательность амплифицированного фрагмента гена 16S рРНК и, сопоставив последовательность варибельного участка с базами данных, определить таксономическое положение выявленного микроорганизма.

Указанный подход уже реализован в коммерческих продуктах (SepsiTest, Molzyme) [30]. К его основным недостаткам относится высокая стоимость, необходимость в дорогостоящей аппаратуре (секвенатор), а также длительность исследования – как правило, более одного рабочего дня. Причем последний недостаток весьма относителен, поскольку традиционная диагностика, основанная на получении гемокультуры еще более длительна – до 48 час. К неоспоримым преимуществам метода относится возможность выявления не только обычных бактериальных патогенов, но и трудно культивируемых, таких как *Coxiella burnetii*, *Bartonella spp.*, *Tropheryma whipplei* и др. При применении диагностической системы Sepsi Test расшифровка этиологии бактериального эндокардита увеличивается в 2 раза [31].

Крайне интересной выглядит одна из последних технологических новинок – система PlexID (Abbott), позволяющая детектировать и идентифицировать непосредственно в биологических образцах бактерии, вирусы и грибы [32]. Система основана на амплификации нескольких тщательно отобранных коротких участков генов рРНК и генов «домашнего хозяйства». Далее с помощью ESI-TOF масс-спектрометрии определяется молекулярная масса полученных ампликонов. На основании данных о молекулярной массе ампликонов с использованием специального программного обеспечения рассчитывается их нуклеотидный состав (процентное содержание отдельных нуклеотидов: аденина, тимина, цитозина и гуанина), а затем при сопоставлении с базой данных осуществляется идентификация микроорганизма.

Методы микробиологической диагностики, не связанные с культивированием, находятся на стадии интенсивного клинического изучения и в настоящий момент еще не ясно, какие окажутся наиболее значимыми.

Новые методы культивирования и идентификации микроорганизмов.

Практически важной инновацией в области культивирования бактерий оказалась разработка хромогенных сред. Они создаются на основе традиционных плотных питательных сред, но включают специфические субстраты (как правило – патентованные), изменяющие цвет колоний при росте отдельных видов бактерий. Использование хромогенных сред позволяет уже на следующий день после первичного посева биологического материала получить предварительную идентификацию бактерий. Так, например, при использовании хромогенных сред для диагностики инфекций мочевыводящих путей на следующий день после первичного посева мочи на чашке Петри колонии *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus mirabilis* будут окрашены разным цветом.

Однако революционные изменения в практике идентификации бактерий и грибов связаны с внедрением технологии прямого белкового профилирования методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight mass spectrometry) [33]. Хотя технические и теоретические основы технологии достаточно сложны, и их адаптация к практическим целям заняла значительное время, но в результате удалось разработать крайне простой метод, доступный для выполнения средним медицинским персоналом. Для проведения идентификации методом прямого белкового профилирования, как и при классической идентификации, необходимо получить в результате первичного посева биологического материала изолированные колонии бактерий или грибов на плотной питательной среде. Далее материал колоний наносят обычной бактериологической петлей на специальную подложку (мишень) и после высыхания добавляют 2 - 3 мкл смеси специальных реагентов (матрицу). Затем мишень вновь высушивают и помещают в MALDI-TOF масс-спектрометр. В результате масс-спектрометрии получают спектр бактериальных белков, который специфичен для каждого вида бактерий или грибов. Идентификация микроорганизмов осуществляется в автоматическом режиме при сравнении с помощью специального программного обеспечения полученного спектра с базой данных бактериальных спектров.

Процедура идентификации 96 образцов за-

нимает немногим более часа. К принципиальным преимуществам метода белкового профилирования, кроме сокращения времени исследования от 8-18 ч до нескольких минут, относится низкая себестоимость реагентов (5-6 руб на один образец). К настоящему времени появились вполне реальные перспективы идентификации бактерий непосредственно из мочи, а также из флаконов для получения гемокультуры с положительным сигналом анализатора. Вполне естественно, что белковое профилирование не решает все проблемы микробиологической диагностики, прежде всего, оценку антибиотикочувствительности микроорганизмов. В то же время необходимо подчеркнуть, что экспрессная идентификация возбудителей инфекции дает крайне важные данные для обоснования рациональной антибактериальной терапии.

Автоматизация микробиологической диагностики.

В течение последних десятилетий технология микробиологических исследований выглядела крайне архаичной по сравнению с другими областями лабораторной диагностики из-за преобладания ручных методов и практически полного отсутствия автоматизации.

Реальный прорыв в этой области четко обозначился в последние годы. В настоящее время на рынке присутствует четыре автоматизированных микробиологических комплекса: WASP (Copan), Previ-Isola (BioMerieux), Innova (Becton-Dickinson) и Inoqula (KIESTRA) [34]. Сравнительный анализ характеристик указанных систем выходит за рамки настоящей работы, более уместно остановиться на их общей идеологии. Основой функционирования автоматизированных комплексов является использование стандартных контейнеров для отдельных видов биологического материала (крови, мочи, мокроты, раневого отделяемого и т.д.) и наличие четких алгоритмов исследований. В этих комплексах удалось автоматизировать один из критичных этапов микробиологического исследования – первичный посев. Есть подходы к автоматизации и всех остальных этапов. Некоторые комплексы интегрируют в свой состав MALDI-TOF масс-спектрометры для идентификации бактерий. Использование автоматизированных систем наиболее перспективно в лабораториях с большим потоком исследований.

Выбор направлений развития микробиологической диагностики в НИИДИ.

При наличии в современных условиях широкого выбора возможностей по совершенствованию микробиологической диагностики перед лабораториями встает проблема выбора оптимального оборудования в зависимости от объема и профиля задач. Необходимо также отметить, что для внедрения новых диагностических технологий необходимо значительное повышение уровня профессиональной подготовки персонала и изменение психологии.

Учитывая особенности практических и научных задач микробиологической диагностики

в НИИДИ – необходимость детекции широкого круга бактериальных, вирусных и грибковых агентов, в том числе редких и новых – при небольшом потоке исследований в качестве **основных направлений развития** определены:

- внедрение коммерческих тест-систем для детекции патогенов методом ПЦР, а также конструирование собственных тест-систем для детекции патогенов, а также детерминант резистентности и вирулентности;
- внедрение MALDI-TOF технологии для идентификации бактерий и анализа генетических полиморфизмов.

Литература

1. Авраменко В.С. О воспроизведении патологического процесса, вызванного некоторыми энтеробактериями, в изолированных петлях кишечника кроликов : дисс ... канд. мед. наук. Л.: НИИДИ, 1972. - 121 с.
2. Кветная А.С. Стратегия взаимоотношений "паразит-хозяин" в инфекциях бактериальной природы у детей // Сб. науч. трудов НИИДИ "Детские инфекции", посвященных 70-летию НИИДИ. СПб., 1997. Вып. V. С.12-21.
3. Кветная А.С. Микробиологические основы патогенеза пневмококковой инфекции у детей : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб. : НИИДИ, 1995. 38 с.
4. Корженевская Т.Б. Клинико-патогенетические особенности бактерионосительства токсигенных коринебактерий дифтерии у детей (клинические, морфофункциональные, патобиохимические и иммунологические аспекты): автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб. : НИИДИ, 1998. - 23 с.
5. Таликова Е.В. Клинико-бактериологические аспекты дизентерии Флекснер у детей в период повышенной заболеваемости, принципы диагностики и терапии : автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб.: НИИДИ, 1998.-26 с.
6. Быценко Д.С. Адаптационные механизмы формирования бактерионосительства токсигенных *Corynebacterium diphtheriae*: автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб. : НИИДИ, 2000. - 22 с.
7. Джихад Мухаммад Салих Хусейн. Роль этиопатогенетических механизмов в обосновании антимикробной терапии дизентерии Флекснера у детей : автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб.: НИИДИ, 2002. - 24 с.
8. Мартынова И.А. Этиопатогенетические механизмы формирования осложнений верхних дыхательных путей при острых респираторно-вирусных инфекциях у детей : автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб.: НИИДИ, 2003. - 20 с.
9. Калиногорская О.С. Микробиологические аспекты коклюшной инфекции у детей : автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб.: НИИДИ, 2006. - 20 с.
10. Железова Л.И. Клинико-лабораторные особенности микроэкологических нарушений слизистой толстой кишки при острых кишечных инфекциях у детей : автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб.: НИИДИ, 2006. - 24 с.
11. Лачкова Л.В. Клинико-патогенетические особенности и тактика терапии кампилобактериоза у детей : автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб.: НИИДИ, 2006. - 24 с.
12. Кветная А.С., Железова Л.И., Тихомирова О.В. Клинико-лабораторные особенности микроэкологических нарушений слизистой толстой кишки при острых кишечных инфекциях у детей // Детские инфекции. 2006.- Т.5, № 4.- С.7-11.
13. Кветная А.С. Алгоритм оценки слизистых в прогнозировании исходов инфекционной патологии у детей. Материалы конференции НИИДИ "Перспективы снижения инфекционной заболеваемости и летальности у детей: патогенез, терапия, профилактика". СПб, 2001.- С. 32-33.
14. Кветная А.С., Насыров Р.А. Пат. № 2033748 Российская Федерация. Способ диагностики нейротрофических смешанной вирусно-бактериальной этиологии / опубл. 15.06.1992.
15. Мельникова А.Ю., Шабсельс Б.М., Власов Г.П., Кветная А.С. Пат. № 2113172 Российская Федерация, МПК G01N33/536. Способ иммунологической экспресс-диагностики токсических форм дифтерийной инфекции / опубл. 20.06.1998, БИ № 17.
16. Кветная А.С., Иванова В.В., Курбатова Г.П., Железова Л.И. Пат. № 2127883 Российская Федерация. Способ экспресс-диагностики дифтерийной инфекции (пероксидазный тест) / опубл. 20.03.1999.
17. Кветная А.С., Калиногорская О.С. Пат.

№ 2247388 Российская Федерация, МПК G01N33/569. Способ экспресс-диагностики коклюша /опубл. 27.02.2005, БИ № 6.

18. Насыров Р.А., Маньков М.В., Кветная А.С. Пат. № 2193204 Российская Федерация, МПК G01N33/53. Способ экспресс-диагностики гемофильной инфекции /опубл. 20.11.2002, БИ № 32.

19. Кветная А.С., Костюкова Н.Н., Гамаюнова В.Б. Пат. № 2310852 Российская Федерация, МПК G01N33/53. Способ экспресс-диагностики гемофильной инфекции типа "b" у детей / опубл. 20.11.2007, БИ № 32.

20. Кветная А.С., Партина И.В. Пат. № 2425384 Российская Федерация, МПК G01N33/569, 33/50. Способ диагностики течения сальмонеллезно-протозойных острых кишечных инфекций у детей / опубл. 27.07.2011, БИ № 21.

21. Иванова В.В., Родионова О.В., Аксенов О.А. и др. Дифтерия у детей Под ред. проф. В.В.Ивановой.- СПб.: Изд-во Политехника. 2000.- 256с.:

22. Сорокина М.П., Иванова В.В., Скрипченко Н.В. Бактериальные менингиты у детей. М.: Медицина, 2003. 320 с.

23. Кветная А.С., Железова Л.И. Стратегия микробиологической диагностики бактериальных гнойных менингитов // Материалы 7-ой Российско-итальянской конф. "Актуальные вопросы социально-значимых вирусных инфекций". Великий Новгород. 2009. С. 68- 72.

24. Васильев В.В., Мурина Е.А., Алексеева Л.А. и др. Комплексные программы оценки риска и ранней диагностики врожденных инфекций // Материалы Всероссийского конгресса НИИ детских инфекций "Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика. СПб. 2010.- С. 61.

25. Кветная А.С., Железова Л.И., Калиногорская О.С. Новые технологии в диагностике бактериальных инфекций у детей // Материалы третьего съезда военных врачей медико-профилактического профиля вооруженных сил Российской Федерации "Достижения науки и практики в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия вооруженных сил Российской Федерации".- СПб.: ВМедА, 2010.- С. 289.

26. Партина И.В., Кветная А.С. Экспресс-метод лабораторной диагностики сальмонеллезно-лямблиозной инфекции у детей // Материалы третьего съезда военных врачей медико-профилактического профиля вооруженных сил Российской Федерации "Достижения науки и практики в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия вооруженных сил Российской Федерации". СПб.: ВМедА, 2010. С. 290.

27. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T. et al: Enterotypes of the human gut microbiome. Nature. 2011. 473(7346): 174-180.

28. Dierkes C., Ehrenstein B., Siebig S., Linde HJ., Reischl U., Salzberger B.: Clinical impact of a commercially available multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis. BMC Infect. Dis. 2009. 9(1): 126.

29. Harris K.A., Hartley J.C.: Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. J Med Microbiol. 2003. 52 (Pt 8): 685-91.

30. Wellinghausen N., Kochem A.J., Disque C., Muhl H. et al: Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis. J Clin Microbiol. 2009. 47(9): 2759-65.

31. Kuhn C., Disque C., Muhl H., Orszag P., Stiesch M., Haverich A.: Evaluation of Commercial Universal rRNA gene PCR plus sequencing tests for identification of bacteria and fungi associated with infectious endocarditis. J Clin Microbiol. 2011. 49(8): 2919-23.

32. Ecker D.J., Sampath R., Li H., Massire C., Matthews H.E., Toleno D. et al: New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections. Expert Rev. Mol. Diagn. 2010 10(4): 399-415.

33. Bizzini A., Greub G.: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. Clin. Microbiol Infect. 2010. 16(11): 1614-1619.

34. Greub G, Prod'hom G: Automation in clinical bacteriology: what system to choose? Clin Microbiol Infect. 2011. 17(5): 655-660.

Авторский коллектив:

Лобзин Юрий Владимирович – засл. деятель науки РФ, академик РАМН, д.м.н., профессор, директор Научно-исследовательского института детских инфекций ФМБА России. Тел.: (812) 234-60-04; e-mail: nauka@niidi.ru

Кветная Ася Степановна – д.м.н., профессор, руководитель отдела микробиологии человека НИИ детских инфекций ФМБА России, Тел.: (812) 234-36-73; e-mail: asya41@mail.ru

Сидоренко Сергей Владимирович – д.м.н., профессор, руководитель отдела молекулярной микробиологии и эпидемиологии НИИ детских инфекций ФМБА России. Тел.: (812) 234-07-40; e-mail: sidorserg@yandex.ru

Самойлова Ирина Геннадьевна – к.м.н., главный врач клиники НИИ детских инфекций ФМБА России. Тел.: (812) 234- 12 -67; e-mail: nauka@niidi.ru