

Результаты выявления SARS-CoV-2 и других возбудителей внебольничных пневмоний методом ПЦР в Тюменской области

Бакштановская И.В.¹, Степанова Т.Ф.¹, Шарухо Г.В.², Летюшев А.Н.^{1,2}, Степанова К.Б.¹, Логинова Н.В.³, Панина Ц.А.¹, Зматракова Е.А.¹, Косырева А.Н.¹,
Бартусевич А.З.¹, Леонтьева С.А.¹, Вишнякова А.О.¹

¹Федеральное бюджетное учреждение науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,

²Управление Роспотребнадзора по Тюменской области,

³Департамент здравоохранения Тюменской области

г.Тюмень

Аннотация: Целью настоящей работы являлось выявление возбудителя внебольничных пневмоний и ко-инфицирования с помощью исследования методом ПЦР биоматериала от пациентов.

Проведено исследование 268 проб от 258 пациентов методом ПЦР для выявления РНК/ДНК возбудителей респираторных инфекций вирусной и бактериальной природы. В 43,3% проб выявлена РНК SARS-Cov-2, в 4,5% – РНК/ДНК возбудителей ОРВИ, в одной пробе – ДНК *Mycoplasma pneumoniae*. Ко-инфекция SARS-Cov-2 обнаружена только с микобактериями туберкулеза у пациентов противотуберкулезного диспансера. У обследованных больных пневмонией РНК SARS-Cov-2 существенно чаще выявлялась в биоматериале из нижних дыхательных путей (52%), чем в респираторных мазках (8,5%). В первую неделю от начала заболевания обнаружено 19,2% положительных проб, во вторую – 56,5%.

Ключевые слова: пневмония, ПЦР, SARS-CoV-2, ко-инфекции

Results of detecting SARS-CoV-2 and other pathogens of community-acquired pneumonia by PCR in the Tyumen region

Bakshtanovskaya I.V.¹, Stepanova T.F.¹, SHaruko G.V.², Letyushev A.N.^{1,2}, Stepanova K.B.¹, Loginova N.V.³, Panina C.A.¹, Zmatrakova E.A.¹, Kosyreva A.N.¹, Bartusevich A.Z.¹, Leont'eva S.A.¹, Vishnyakova A.O.¹

¹Tyumen Region Infection Pathology Research Institute

²Department of Rospotrebnadzor in the Tyumen region

³Department of Health of the Tyumen Region

Tyumen

Abstract: The purpose of this work was to identify the causative agent of community-acquired pneumonia and co-infection using a PCR study of biomaterial from patients.

A study of 268 samples from 258 patients by the PCR method was carried out to identify RNA / DNA of viral and bacterial pathogens of respiratory infections. In 43.3% of samples SARS-Cov-2 RNA was detected, in 4.5% - RNA / DNA of acute respiratory viral infections pathogens, in one sample – DNA of *Mycoplasma pneumoniae*. Co-infection with SARS-Cov-2 was detected only with mycobacterium tuberculosis in patients of the anti-tuberculosis dispensary. In the examined patients with pneumonia, SARS-Cov-2 RNA was significantly more often detected in biomaterial from the lower respiratory tract (52%) than in respiratory smears (8.5%). In the first week from the onset of the disease, 19.2% of positive samples were found, in the second – 56.5%.

Key words: pneumonia, PCR, SARS-CoV-2, co-infections

Для заболевания, вызываемого новым коронавирусом (SARS-CoV-2) характерно преимущественное поражение нижних дыхательных путей (Базыкина и др.). Входными воротами возбудителя являются эпителий верхних дыхательных путей и эпителиоциты желудка и кишечника, после Начальным этапом заражения является проникновение SARS-CoV-2 в клетки-мишени, имеющие рецепторы ангиотензинпревращающего фермента II типа, при этом основной и быстро достижимой мишенью являются альвеолярные клетки II типа легких, что определяет развитие пневмонии [1].

В условиях распространения COVID-19 к приоритетам первого уровня при организации исследований и противоэпидемических мероприятий относится проведение лабораторных исследований лиц с диагнозом «внебольничная пневмония» (СП 3.1.3597-20 «Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» [2].

Вариативность и динамическое изменение рентгенологической картины пневмонии, вызванной SARS-CoV-2, может затруднять дифференциальную диагностику с пневмониями, вызванными другими возбудителями, поэтому у пациентов с тяжелым течением вирусной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2, актуально изучение различных вариантов ко-инфицирования (бактериальными, грибковыми патогенами, другими вирусами) [3]. Показано, что ко-инфицирование несколькими вирусами выявлялось у 3% заболевших, наиболее часто у них изолировали респираторно-синцитиальный вирус (16,9%) и грипп типа А (15,5%) [4]. В Северной Калифорнии в пятой части SARS-CoV-2-положительных образцов обнаруживались прочие возбудители респираторных инфекций, наиболее часто обнаруживались риновирусы (7%), респираторно-синцитиальный вирус (5%) и отличные от SARS-CoV-2 коронавирусы (4%) [5]. Поскольку инфекционные агенты вирусной природы играют ведущую роль в структуре инфекционных заболеваний неясной этиологии, мониторинг известных вирусных патогенов – важный аспект эпидемиологического надзора, необходимый для своевременного реагирования на возникающие угрозы [6]. Ко-инфекции способны приводить к увеличению летальности, в связи с чем дифференциальная диагностика пневмоний, вызванных SARS-CoV-2, с выявлением других патогенов, представляется актуальной задачей.

На территории Тюменской области за 28 недель 2020г. было зарегистрировано 8 235 случаев внебольничных пневмоний, что на 33,9% выше, чем в аналогичном периоде 2019 г. (6147 сл.). Уровень кумулятивной заболеваемости на 28 неделю составил 542,2 на 100 тыс. населения и превысил в 1,9 раз среднемноголетний показатель (СМП 2017-2019 – 287,8).

Всего на 14.07.2020 г. с диагнозом «внебольничная пневмония» было госпитализировано 4950 человек (60,1%), из них у 3564 человек проведены исследования для уточнения возбудителя, охват обследованием составил 83,6%. Выделено 1068 возбудителей, частота выделения патогенного агента составила 25,8%.

В структуре выделенных возбудителей первое место занимали вирусы негриппозной этиологии — 556 (52,1%). Далее по мере убывания расположились другие бактериальные патогенные агенты — 406 (38,0%), пневмококки — 73 (6,8%), вирусы гриппа – 19 (1,8%), микоплазмы — 11 (1,1%). Доля расшифрованных случаев ВП от числа госпитализированных составила 21,6%.

В связи с поручением Руководителя Роспотребнадзора (письмо Роспотребнадзора № 02/7045-2020-26 от 15.04.2020, во исполнение пункта 2 перечня поручений Правительства Российской Федерации от 8 апреля 2020 г. № ММ-П13-3019кв по итогам заседания президиума Координационного совета при Правительстве Российской Федерации по борьбе с распространением новой коронавирусной инфекции на территории Российской Федерации 8 апреля 2020 г.) с целью установления причины заболевания (возбудителя) при госпитализации в медицинскую организацию граждан с подозрением на пневмонию или с подтвержденной пневмонией, ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора с 16.04.2020 организовал получение от медицинских организаций проб биоматериала и проводит их лабораторное исследование методом ПЦР и бактериологическими методами с применением масс-спектрометрии.

Издан совместный приказ Управления Роспотребнадзора по Тюменской области, ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора и Департамента здравоохранения Тюменской области № 73 / 41/о / 309 от 13.05.2020 г. «Об этиологической расшифровке случаев заболевания внебольничными пневмониями в Тюменской области», в соответствии с которым руководители медицинских организаций, оказывающих медицинскую помощь (стационарную и амбулаторную) больным с диагнозом внебольничная пневмония, обеспечивают забор и доставку биологического материала, а институт – лабораторные исследования поступившего материала по установлению возбудителя.

В институт поступают образцы биоматериала из моногоспиталей, организованных на базе медицинских организаций области, медицинских учреждений и поликлиник г. Тюмени:

- Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Тюменской области «Областная клиническая больница №1»
- ГБУЗ ТО «Госпиталь для ветеранов войн»
- ГБУЗ ТО «Областная больница № 11» (р.п. Гольшманово, Омутинская ЦРБ)
- ГБУЗ ТО «Областная больница № 23» (г. Ялуторовск)
- ГБУЗ ТО «Областная больница № 9» (с. Вагай)
- ГБУЗ ТО «Областная больница № 24» (с. Ярково)
- ГБУЗ ТО «Областная больница № 19»
- ГБУЗ ТО «Областной противотуберкулезный диспансер»

- Филиал Томского НИМЦ «Тюменский кардиологический научный центр»
- ГАУЗ ТО "Городская поликлиника № 3"
- ГАУЗ ТО "Городская поликлиника № 13"

Целью настоящей работы являлось выявление возбудителя внебольничных пневмоний и ко-инфицирования с помощью исследования методом ПЦР биоматериала от пациентов с подозрением на COVID-19.

Материалы и методы

Проведено исследование 268 проб от 258 пациентов, в том числе:

- 214 проб мокроты и бронхо-альвеолярный лаваж,
- 47 проб респираторных мазков и
- 7 проб мочи.

В соответствии с методическими рекомендация МЗ РФ по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции [1], для проведения дифференциальной диагностики у всех заболевших проводят исследования методом ПЦР на возбудители респираторных инфекций: вирусы гриппа типа А и В, респираторно-синцитиальный вирус, вирусы парагриппа, риновирусы, аденовирусы, человеческие метапневмовирусы, MERS-CoV, а также микробиологическую диагностику и/или ПЦРдиагностику на *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* type B, *Legionella pneumophila*, а также иные возбудители бактериальных респираторных инфекций нижних дыхательных путей.

В настоящей работе поступившие пробы исследовали методом ПЦР для выявления РНК/ДНК следующих возбудителей:

1. Коронавирус SARS-CoV-2 (тест-системами Вектор-ПЦРrv-2019-nCoV-RG (ГНЦ Вектор Роспотребнадзора) Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG (ГНЦ Вектор Роспотребнадзора) SARS-CoV-2/SARS-CoV (ДНК-технология))
2. Коронавирусы, вызывающие тяжелую респираторную инфекцию: MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus) и SARS-CoV (Severe acute respiratory syndrome coronavirus)
3. Микобактерии туберкулеза
4. Возбудители ОРВИ:

- респираторносинцитиальный вирус (human Respiratory Syncytial virus - hRSv),
 - метапневмовирус (human Metapneumovirus-hMpv),
 - вирусы парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (human Parainfluenza virus-1-4-hPiv),
 - коронавирусы (human Coronavirus - hCov),
 - риновирусы (human Rhinovirus -hRv),
 - аденовирусы групп В, С и Е (human Adenovirus В, С, Е- hAdv),
 - бокавирус (human Bocavirus - hBov)
5. Вирусы гриппа А и вирусы гриппа В
 6. Вирус гриппа А субтип А/Н1N1(sw2009)
 7. Вирус гриппа А субтип Н5N1
 8. Вирус гриппа А субтипы Н1N1 и Н3N2
 9. Возбудители коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*)
 10. *Legionella pneumophila*
 11. *Listeria monocytogenes*
 12. *Brucella spp.*
 13. *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae*
(№№ 2-13 – тест-системами производства Амплисенс)

Проводилось также микробиологическое исследование, результаты которого представлены в отдельной публикации [7].

Результаты и обсуждение

В 116 из 268 проб (43,3%) от пациентов выявлена РНК SARS-Cov-2.

В трех случаях у пациентов обнаружено одновременно наличие РНК SARS-CoV-2 и SARS-CoV. В двух образцах выявлена только РНК SARS-CoV.

Из 14 проб от пациентов противотуберкулезного диспансера в 9 была обнаружена РНК SARS-CoV-2, у одного – аденовирус. Во всех пробах этих пациентов была обнаружена ДНК микобактерий туберкулеза.

РНК возбудителей гриппа в исследованных пробах не обнаружены.

РНК/ДНК возбудителей ОРВИ обнаружены в 12 пробах мокроты и мазков (4,5%):

- Респираторно-синцитиального вируса (human Respiratory Syncytial virus - hRSv) – 1 проба;
- метапневмовируса (human Metapneumovirus-hMpv) – 1 проба,

- вирусы парагриппа 2 типа (human Parainfluenza virus-1-hPIV) – 5 проб,
- вирусы парагриппа 4 типа (human Parainfluenza virus-4-hPIV) – 1 проба,
- коронавирусов NL-63, 229E (human Coronavirus - hCov) – 4 пробы,
- аденовирусов групп В, С и Е (human Adenovirus В, С, Е- hAdv) – 2 проба.

В двух пробах мокроты обнаружены одновременно РНК вируса парагриппа 2 типа и коронавирусов NL-63, 229Е.

В одной пробе выявлено наличие ДНК *Mycoplasma pneumoniae*.

В пробах, где обнаружены возбудители ОРВИ и микоплазмы, РНК SARS-Cov-2 не выявлена.

В двух случаях в пробах мокроты обнаружено сочетание ДНК микобактерий туберкулеза с ДНК аденовирусов (в одном случае) и *Brucella* spp. (во втором).

ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхосептикоза, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydomphila pneumoniae* не обнаружены.

В весенний период (апрель-май 2020 года) в 28 из поступивших 98 проб (28%) выявлено наличие РНК SARS-Cov-2, именно в этот период в пробах без нового коронавируса обнаружены РНК/ДНК возбудителей ОРВИ. В следующие два летних месяца (июнь-июль 2020 года) среди поступивших 160 проб в 86 (53,8%) обнаружена РНК SARS-Cov-2, возбудители ОРВИ и гриппа не выявлялись, однократно обнаружена ДНК *Mycoplasma pneumoniae*.

У обследованных нами больных пневмонией РНК SARS-Cov-2 существенно чаще выявлялась в биоматериале из нижних дыхательных путей (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, аспираты из трахеи и бронхов) (52%, 112 проб из 214), чем в респираторных мазках (8,5%, 4 из 47 проб). Эти результаты согласуются с литературными данными, свидетельствующими, что SARS-CoV-2 обнаруживается чаще и с более высокими вирусными нагрузками в образцах нижних дыхательных путей, чем в образцах верхних дыхательных путей, особенно на поздних этапах инфекции, по-видимому, в связи с активной репликацией SARS-CoV-2 в легких [8]. Во многих работах показано, что наиболее оптимальным видом биологического материала для своевременного выявления новой коронавирусной инфекции у пациентов с пневмониями является мокрота [3].

По-видимому, существует и определенная динамика выявления РНК нового коронавируса в мокроте в зависимости от длительности заболевания к моменту забора проб: в первую неделю от начала заболевания нами обнаружено 19,2% положительных проб, во вторую – 56,5%; при отсчете срока от момента госпитализации и в первую, и во вторую неделю с момента обращения РНК SARS-Cov-2 обнаруживался примерно в половине проб (46,3% в первую неделю, 58,3% – во вторую).

Таким образом, в условиях пандемии при установлении этиологии внебольничных пневмоний необходима «ковидная настороженность», особенно в летний период (при низкой вероятности вирусных пневмоний, связанных с ОРВИ). Полученные результаты свидетельствуют, что ко-инфекции выявляются в небольшом проценте случаев, однако для установления этиологического агента необходимо проводить исследования наиболее показательного биоматериала (при пневмониях – из нижних дыхательных путей) и в соответствующие сроки от начала заболевания.

Список литературы:

1. Министерство здравоохранения РФ. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 7 (03.06.2020). 166 с.
2. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации №15 от 22.05.2020 «Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.3597-20 «Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Российская газета – Федеральный выпуск №115 (8169) от 26 мая 2020 г.
3. Базыкина Е. А., Троценко О. Е., Корита Т. В., Балахонцева Л. А., Котова В. О. 2020. Особенности пневмоний, вызванных новым коронавирусом SARS-COV-2 (Обзор литературы). COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. <https://doi.org/10.21055/preprints-3111730>
4. Lansbury L., Lim B., Baskaran V., Lim W.S. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. J Infect. 2020 Aug;81(2):266-275. doi: 10.1016/j.jinf.2020.05.046. Epub 2020 May 27.
5. David Kim, James Quinn, Benjamin Pinsky, et al. Rates of Co-infection Between SARS-CoV-2 and Other Respiratory Pathogens. Published Online: April 15, 2020. doi:10.1001/jama.2020.6266. Электронный ресурс: <https://medvestnik.ru/content/news/Koinfekcii-drugimi-respiratornymi-patogenami-byli-obnaruzeny-u-20-pacientov-s-koronavirusom.html>. Ссылка активна на 25.07.2020

6. Хафизов К.Ф., Сперанская А.С., Мацвай А.Д., Шипулин Г.А., Дедков В.Г. Передовые технологии в диагностике вирусных заболеваний неясной этиологии. Инфекция и иммунитет. 2020;10(1):9-25.
7. Катаева Л. В., Степанова Т. Ф., Степанова К. Б., Бакштановская И. В., Посоюзных О. В., Ташланова В. В., Карпухина Н. Ф., Колотова О. Н., Калашникова Ю. Н., Вакарина А. А. 2020. Микробиоценоз нижних дыхательных путей при пневмонии, ассоциированной с SARS-COV-2. COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. <https://doi.org/10.21055/preprints-3111755>
8. Lu X, Wang L, Sakthivel SK, Whitaker B, Murray J, Kamili S, et al. US CDC Real-Time Reverse Transcription PCR Panel for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. Emerg Infect Dis. 2020;26(8):1654-1665. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2608.201246>. Электронный ресурс: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/8/20-1246_article?deliveryName=USCDC_331-DM33397#r3. Ссылка активна на 02.08.2020