

КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МЕТОДА ПЦР В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Н. О. ИЛЬИНА, Л. Н. МАЗАНКОВА, А. Т. ПОДКОЛЗИН

ГОУ ДПО РМАПО МЗ СР РФ, КАФЕДРА ДЕТСКИХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ С КУРСОМ ДЕТСКОЙ ДЕРМАТОЛОГИИ

Под наблюдением находилось 528 детей от 1 мес. до 14 лет с клиникой острой кишечной инфекции. С целью уточнения этиологии заболевания всем детям проводилось исследование фекалий на присутствие генетического материала возбудителей ОКИ методом ПЦР. Результаты ПЦР исследования оценивались с клинических позиций, основанных на установлении типа диареи и топики поражения ЖКТ. Метод ПЦР-диагностики ОКИ в сравнении с традиционными методами лабораторной диагностики явился более эффективным и позволил достоверно повысить процент этиологической расшифровки ОКИ (с 29,2 до 83,3%). ПЦР-диагностика имела преимущество в этиологической расшифровке вирусных диарей, выявляемых в 61,2% случаев, протекающих в подавляющем большинстве по осмотическому типу, а также смешанных форм ОКИ (13,1%). Выявление при инвазивном и секреторном типах диареи вирусных агентов не исключало их этиологической роли в развитии микс-инфекций наряду с неидентифицированной бактериальной флорой. Информативность метода ПЦР оказалась наиболее высока при ОКИ, протекающих с симокомплексом гастроэнтерита, в 88,2% ассоциированного с ротавирусами, в 77,9% — прочими вирусными агентами и в 61,2% — смешанной этиологией заболевания. Клиническая диагностика острых кишечных инфекций, основанная на этиопатогенетической классификации ОКИ по типам диареи и определении топики поражения ЖКТ необходима для правильной интерпретации результатов ПЦР-исследования. Ключевые слова: острые кишечные инфекции, дети, ПЦР-диагностика, топики поражения ЖКТ, типы диареи

Острые кишечные инфекции (ОКИ) на современном этапе остаются одной из важнейшей проблем детской инфекционной патологии, в связи с высоким уровнем заболеваемости, значительной частотой развития тяжелых форм болезни и высокой летальностью. По данным Всемирной Организации Здравоохранения ежегодно в мире острые кишечные инфекции переносят около 2 млрд. человек, при этом 60—65% всех случаев ОКИ регистрируется среди детей. Особенно высока заболеваемость детей раннего возраста (до 70%) [1,2].

В России на фоне высокой заболеваемости острыми кишечными инфекциями (в 2004 году — 1300 на 100 тыс. детского населения), уровень их этиологической диагностики остается низким. В соответствии с официальной статистикой федерального Центра Госсанэпиднадзора РФ, в период с 2000 г. по 2004 г. регистрировалось до 65—75% ОКИ с неустановленной этиологией, причем у детей этиологическая расшифровка кишечных инфекций была еще ниже [3].

В большинстве зарубежных публикаций указывается на более высокую эффективность (до 70—80%) этиологической верификации ОКИ [4—7]. Вместе с тем, имеются значительные отличия в структуре установленных диарей. Если в России до сих пор большинство расшифрованных ОКИ этиологически связано с бактериальными агентами (сальмонеллами и шигеллами), а среди вирусных диарей этиологическое подтверждение находит в основном ротавирус (от 7 до 35%), то по данным международной статистики до 80% всех диарей ассоциируются с вирусными агентами, среди которых помимо ротавируса выявляются калицивирусы, астро- и аденовирусы [4—6, 8—10]. Неудовлетворительное состояние этиологической расшифровки ОКИ в России связано с несовершенством и ограниченностью имеющихся методов лабораторной диагностики (низкая результативность, длительность проведения анализов, отсутствие возможности рутинно определять труднотипируемых возбудителей ОКИ и др.), следствием чего является высокий уровень ошибок в диагностике и лечении инфекционных диарей [11]. Приведенные данные свидетельствуют о необходи-

мости совершенствования методов диагностики, и особенно ранней диагностики ОКИ.

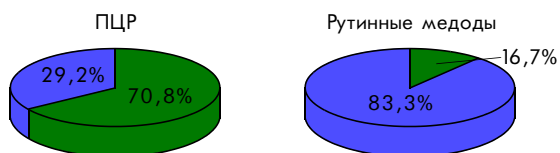
Одним из перспективных в данном направлении диагностических методов, широко используемых в других областях инфекционной патологии и медицины в целом, является метод детекции специфических последовательностей нуклеиновых кислот возбудителей ОКИ в фекалиях с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Доказана высокая чувствительность и специфичность метода ПЦР при вирусных гепатитах, ВИЧ-инфекции, герпетических, урогенитальных инфекциях. В отечественной литературе есть лишь единичные работы об использовании ПЦР для этиологической расшифровки инфекционных диарей [11—14]. Однако в этих работах приводится лишь статистическая оценка и эпидемиологические данные. Вопросы клинической интерпретации нового лабораторного метода обследования детей с ОКИ этими авторами не рассматриваются. Целью настоящего исследования явилось изучение современной этиологической структуры ОКИ у детей с применением прямых методов детекции генетического материала возбудителей в фекалиях больных методом ПЦР, а также клиническая оценка этого метода в диагностике инфекционных диарей у детей.

Материалы и методы исследования

В течение одного года методом случайной выборки обследовано 528 детей, госпитализированных в 4 инфекционное отделение Тушинской ДГБ (гл. врач Смирнов В. Ф.) с клинической картиной острой кишечной инфекции.

На долабораторном этапе всем детям проводилась клиническая диагностика острых кишечных инфекций с установлением типа диареи, основанное на классификации и этиопатогенетическом подходе к развитию диарейного синдрома [15].

По типу диареи все дети были распределены следующим образом: у 296 больных (56,1%) диарея протекала по осмотическому типу, у 140 (26,5%) — имел место инвазивный тип, а в 79 случаях (14,9%)



■ — Этиология установлена ■ — Этиология не установлена

Рисунок 1. Этиологическая расшифровка ОКИ у детей ($n = 528$)

отмечалась секреторная диарея. У 13 детей (2,5%) заболевание протекало без развития диареи.

По топике поражения ЖКТ среди 528 обследованных детей у 13 (2,5%) отмечался гастрит, у 330 (62,5%) — гастроэнтерит, в 46 случаях (8,7%) имел место энтерит, в 22 (4,2%) — энтероколит, у 92 детей (17,4%) установлен гастроэнтероколит, в 24 случаях (4,5%) имелись признаки колита, а в одном случае (0,2%) дистального колита.

Исследование методом ПЦР проводилось на базе Центрального НИИ эпидемиологии Министерства здравоохранения и социального развития РФ (под руководством ст. научн. сотр. Шипулина Г. А.). Клинический материал от больных тестировался на наличие ротавирусов, норо-, астро-, аденовирусов, микроорганизмов рода шигелла и энтероинвазивных *E. coli* (ЭИКП), сальмонелл, кампилобактера и *Y. enterocolitica*.

Для амплификации нуклеиновых кислот вирусов и бактериальных патогенов использовались наборы реагентов «АмпЛиСенс» (производства ГУ Центрального НИИ эпидемиологии МЗ и СР РФ, Москва). Рутинная лабораторная диагностика ОКИ осуществлялась в условиях бактериологической лаборатории Тушинской ДГБ.

Результаты и их обсуждение

При проведении ПЦР-исследования этиологию ОКИ удалось установить у 374 детей (70,8%), что более чем в 4 раза превышает процент этиологической расшифровки с использованием комплекса рутинных методов диагностики (рис. 1).

Среди острых кишечных инфекций, этиология которых установлена методом ПЦР, подавляющее большинство составили вирусные моноинфекции (61,2%), в 25,7% случаев уточнена этиология бактериальных моноинфекций. 13,1% расшифрованных диарей пришлось на долю смешанных (вирусно-вирусных, вирусно-бактериальных и бактериально-бактериальных) инфек-

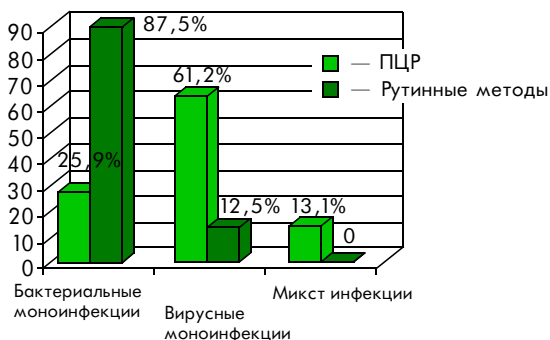


Рисунок 2. Эффективность разных методов этиологической расшифровки ОКИ у детей

ций. В структуре ОКИ, расшифрованных с применением комплекса рутинных методов лабораторной диагностики преобладали бактериальные моноинфекции (87,5%) и лишь в 12,5% случаев подтверждена этиологическая роль вирусных агентов (в 100% случаев — ротавируса). Ни в одном случае смешанная этиология заболевания установлена не была (рис. 2).

В целом этиологическая структура ОКИ у детей при использовании метода ПЦР оказалась более разнообразной и значительно отличалась от таковой при обычной лабораторной диагностике (рис. 3).

Так, проведение ПЦР-исследования позволило в 40,6% случаев выявить ротавирус. На 2 месте по частоте встречаемости была группа прочих вирусных агентов (20,6%), представленная в большинстве случаев (65%) норовирусами II типа, реже выделялись аденовирусы (23%) и в единичных случаях — астро-, саповирусы и ротавирус гр. С. Гораздо реже вирусных прямыми методами детекции выявлялись бактериальные возбудители: у 40 больных (10,7%) — сальмонелла, у 39 (10,4%) — шигелла/ЭИКП, в 16 случаях (4,3%) — кампилобактер и у 1 ребенка (0,3%) — *Y. enterocolitica*. У 49 пациентов (13,1%) выявлялись кишечные инфекции сочетанной этиологии с обнаружением двух, а в 1 случае — трех возбудителей. Структура диарей, расшифрованных рутинными методами, выглядела иначе: 1 и 2 место занимали бактериальные кишечные инфекции: в 44,3% случаев (у 39 детей) — сальмонеллез и в 36,4% случаев (у 32 детей) — шигеллез. И только на 3 месте по частоте встречаемости находилась ротавирусная инфекция, выявленная у 11 детей (12,5% от числа обследованных методом ИФА). В 5,9% случаев (5 детей) установлена эшерихиозная этиология (ЭПКП) и в 1,1% (1 ребенок) — иерсиниозная этиология заболеваний.

По данным ПЦР, большую группу расшифрованных диарей (49 случаев) составили инфекции сочетанной этиологии с обнаружением двух и более возбудителей, удельный вес которых составил 13,1%. При этом наиболее часто встречались вирусно-вирусные ассоциации, при которых одним из этиологических факторов был ротавирус, что составило 46,9% от общего числа смешанных форм, а также вирусно-бактериальные сочетания (42,9%). Одновременное выявление двух бактериальных агентов отмечалось гораздо реже (в 8,2% случаев). У одного ребенка (2%) имело место сочетание трех возбудителей: двух вирусов и сальмонеллы.

Проведено изучение этиологии ОКИ в возрастном аспекте. В разных возрастных группах детей возбудители встречались с различной частотой. У детей младшего возраста в этиологической структуре преобладали ротавирусы: в 51,8% случаев у детей грудного возраста и в 47,5% — в возрастной группе от 1 года до 3 лет. Более чем в два раза реже у этих детей выявлялись прочие вирусные агенты: в 19,3 и в 18,6% соответственно. Установлено, что у детей старшего возраста (3—7 лет) возрастает этиологическая роль прочих вирусных агентов (27,1%), а в группе детей старше 7 лет они встречаются чаще, чем ротавирус (22,7 и 13,6% соответственно). В этой же группе детей, в отличие от других возрастных групп, на первое место среди этиологических факторов выходят бактериальные возбудители: в 29,7% случаев — шигеллы и в 22,7% — сальмо-

неллы. Сочетанные формы ОКИ чаще всего встречались у детей младшего возраста (в 19,2% случаев у детей до 1 года и в 13,6% — в группе детей от 1 года до 3 лет).

Вклад различных возбудителей в общую заболеваемость ОКИ был подвержен сезонным колебаниям (рис. 4). Анализ сезонных различий показал отчетливую зимне-весеннюю сезонность, характерную для ротавирусной инфекции с пиком заболеваемости в феврале-марте (50—52% в структуре всех ОКИ).

Менее значительным колебаниям в течение года, с некоторой тенденцией роста в осенние и зимние месяцы, с максимальным подъемом до 21% в ноябре, характеризовались ОКИ, вызванные прочими вирусными агентами.

Практически для всех кишечных инфекций бактериальной этиологии была характерна летне-осенняя сезонность, наиболее отчетливо выраженная при сальмонеллезе с пиком (26% от всех ОКИ) в сентябре.

Одним из важных критериев ранней диагностики острых кишечных инфекций является установление типа диареи по совокупности клинико-анамнестических данных, что необходимо в первую очередь, для проведения адекватной этиопатогенетической терапии. Данные объективного обследования на долабораторном этапе позволили установить у 65% детей осмотический тип диареи, у 26,5% — инвазивный и у 15% — секреторный тип диареи. У 2,5% детей заболевание протекало без диареи.

При сопоставлении результатов клинической диагностики и лабораторного подтверждения этиологии ОКИ методом ПЦР (рис. 5) установлено, что подавляющее большинство кишечных инфекций ротавирусной этиологии протекало по осмотическому типу. Однако в этой группе инфекций в единичных случаях имели место секреторный (3,3%) и даже инвазивный (4,6%) типы диареи, не характерные для ротавирусной инфекции. В данном случае нельзя исключить вероятность сочетания ротавирусов с неидентифицированными бактериальными агентами.

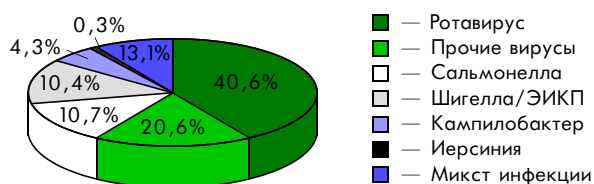
В группе ОКИ вирусной этиологии (из группы прочих вирусов) наблюдалась аналогичная ситуация: при подавляющем большинстве диарей, протекающих по осмотическому типу, в редких случаях регистрировались нетипичные диареи инвазивного и секреторного типа, в этиологии которых, вероятнее всего играла роль бактериальная флора, неидентифицированная методами лабораторной диагностики. У 5% детей этой группы диарейный синдром отсутствовал.

У 50% обследованных детей с сальмонеллезом имел место секреторный тип диареи, а в 47,5% случаев диарея протекала по инвазивному типу. У 1 ребенка имело место течение сальмонеллеза без диареи (острый инфекционный гастрит).

Шигеллез/энтероинвазивный эшерихиоз в большинстве случаев (92,3%) характеризовался развитием инвазивной диареи. Ни в одном случае бактериальной моноинфекции осмотический тип диареи не регистрировался.

В группе детей с сочетанной этиологией ОКИ 57,2% диарей протекало по осмотическому типу, что согласуется с результатами этиологической расшифровки (преобладание в составе смешанных форм вирусных агентов), 30,6% случаев кишечных микс-инфекций имел место инвазивный, а в 12,7% — секреторный тип диареи.

Этиологическая структура ОКИ у детей по данным ПЦР (n = 374)



Этиологическая структура ОКИ у детей по данным рутинных методов диагностики (n = 88)

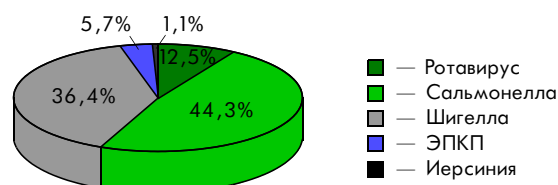


Рисунок 3. Этиологическая структура ОКИ у детей по данным разных методов лабораторной диагностики

Не менее важным критерием клинической диагностики острых кишечных инфекций является установление по совокупности симптомов локализации и распространенности патологического процесса в ЖКТ — топки поражения или топического диагноза. До получения результатов лабораторной диагностики у 330 детей (62,5%) установлен гастроэнтерит, у 92 детей (17,4%) — гастроэнтероколит, в 22 случаях (4,2%) — энтероколит. Реже регистрировались локализованные формы поражения ЖКТ: у 13 детей (2,5%) — гастрит, у 46 детей (8,7%) — энтерит, в 24 случаях (4,5%) — колит и в одном случае (0,2%) — дистальный колит. Эти данные свидетельствуют о преобладании у детей более распространенных форм поражения ЖКТ, что можно объяснить анатомофизиологическими особенностями детского возраста.

При сопоставлении результатов клинической диагностики с данными этиологической расшифровки методом ПЦР, отмечено, что в группе детей с ротавирусной

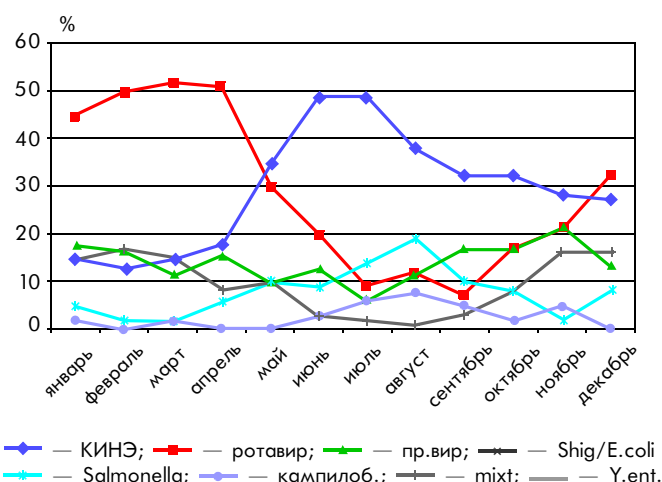


Рисунок 4. Удельный вес ОКИ различной этиологии в разные месяцы в течение года по данным ПЦР

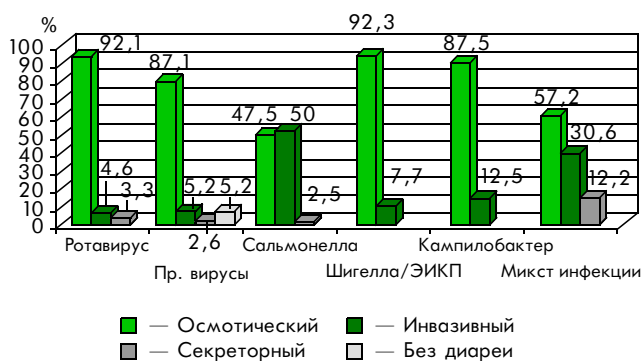


Рисунок 5. Типы диареи в этиологической структуре ОКИ по данным ПЦР

инфекцией в 88,2% случаев поражение ЖКТ характеризовалось развитием гастроэнтерита, в 7,2% случаев — энтерита, реже нетипичного для этого вида инфекций вовлечения в процесс толстой кишки с развитием энтероколита (2,6%) и гастроэнтероколита (2%).

В группе инфекционных диарей, вызванных прочими вирусными агентами, в большинстве случаев имел место гастроэнтерит (72,3%), в 11,7% случаев — энтерит. 5,2% инфекций этой группы протекало по типу гастрита и аналогично ротавирусной инфекции — в 5,2% случаев вирусных диарей регистрировался гастроэнтероколит, что не исключает возможность ассоциации вирусов с бактериальными агентами.

При сальмонеллезе наиболее частыми вариантами топического диагноза были: гастроэнтерит (42,5%) и гастроэнтероколит (37,5%), одинаково часто (по 5%) регистрировались энтероколит и колит и в одном случае (2,5%) — гастрит.

При шигеллезе/энтероинвазином эшерихиозе в подавляющем большинстве случаев имело место поражение толстого отдела кишечника в различных сочетаниях: 71,8% — гастроэнтероколит, 10,2% — энтероколит, 7,7% — колит и 1 случай (2,6%) дистального колита. В 7,7% случаев заболевание протекало по типу гастроэнтерита.

Для кампилобактериоза наиболее характерными топическими диагнозами были: гастроэнтероколит (43,75%) и колит (31,25%). С одинаковой частотой регистрировались гастроэнтерит и энтероколит (по 12,5%).

Среди смешанных форм ОКИ преобладали распространенные варианты поражения ЖКТ: гастроэнтерит — 61,2% и гастроэнтероколит — 30,6%. 8,2% случаев микст инфекций протекало по типу энтерита.

Выводы

1. Метод ПЦР-диагностики ОКИ в сравнении с традиционными методами лабораторной диагностики является более эффективным и позволяет достоверно повысить процент этиологической расшифровки ОКИ (с 29,2 до 83,3%), в основном за счет верификации вирусных инфекций и смешанных форм ОКИ, а также выявления некультивируемого обычными методами кампилобактера.

2. ПЦР-диагностика имеет преимущество в этиологической расшифровке вирусных диарей, выявляемых в 61,2% случаев, протекающих в подавляющем большинстве по осмотическому типу, а также смешанных форм ОКИ (13,1%). Идентифицированные рутинными методами

инвазивные и секреторные диареи чаще этиологически связаны с бактериальными агентами: сальмонеллами и шигеллами. Выявление при инвазивном (9,8%) и секреторном (5,9%) типе диареи вирусных агентов не исключает их этиологической роли в развитии микст инфекций с неидентифицированной бактериальной флорой.

3. Информативность метода ПЦР наиболее высока при ОКИ, протекающих с симптомокомплексом гастроэнтерита, в 88,2% ассоциированного с ротавирусами, в 77,9% — прочими вирусными агентами и в 61,2% — смешанной этиологией заболевания.

4. Клиническая диагностика острых кишечных инфекций, основанная на этиопатогенетической классификации ОКИ по типам диареи и определении топике поражения ЖКТ в сопоставлении с данными, полученными с помощью ПЦР, позволяет правильно интерпретировать эти результаты, что необходимо в первую очередь для выбора адекватной лечебной тактики.

Литература:

1. The World Health Report 2003: Shaping the Future. — Geneva, WHO, 2003.
2. Боковой А. Г. Интенсивная терапия в педиатрии. Сетевой учебник / Совместный проект педиатров США, Испании, России и Франции. — <http://picuBOOK.net>.
3. Информационный бюллетень Федерального ЦГСЭН РФ 2000—2004 гг.
4. Mustafa H. Epidemiology of Astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia over period of four consecutive years 1995 to 1998 / H. Mustafa, R. Bishop, E. Palombofe // *Ibid.* — 2000. — V. 38. — P. 1058—1062.
5. Bon F. Prevalence of group A Rotavirus, Human Calicivirus, Astrovirus, and Adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France / E. Bon, M. Dauvergnat, D. Tenenbaumte // *J. Clin. Microbiol.* — 1999. — V. 37. — P. 3055—3058.
6. Inouye S. Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents / S. Inouye, K. Yamashita, S. Yamadera // *JID.* — 2000. — 181 (2). — P. 270—274.
7. Etiology of Gastroenteritis in Sentinel General Practices in the Netherlands / M. de Wit et al. // *Clin. Infect. Dis.* — 2001. — V. 33. — P. 280—288.
8. Etiology of community-acquired pediatric viral diarrhea: a prospective longitudinal study in hospitals, emergency departments pediatric practices and child care centers during the winter rotavirus outbreak, 1997 to 1998 / V. Waters et al. // *Pediatric Infect. Dis. J.* — 2000. — № 9. — V. 19. — P. 843—848.
9. Walter J. Astrovirus infection in children / J. Walter, D. Mitchell // *Curr. Opin. Infect. Dis.* — 2003. — V. 16. — № 3. — P. 247—253.
10. Natural history of human Calicivirus infection: a prospective cohort study / B. Rockx et al. // *JID.* — 2002. — 35. — P. 246—253.
11. Покровский В. И. Инфекционные болезни в конце XX века и санитарно-эпидемиологическое состояние в XXI веке / В. И. Покровский, Г. Г. Онищенко, Б. А. Черкасский // *Ж. микробиологии.* — 2002. — № 3. — С. 16—23.
12. Изучение этиологии острых кишечных инфекций у детей, госпитализированных в инфекционные отделения стационаров Москвы / А. Т. Подколзин и др. // *Инфекционные болезни.* — 2004. — Т. 2. — № 4. — С. 85—91.
13. Диагностика ротавирусной инфекции методом полимеразной цепной реакции / А. А. Мухина и др. // *Эпидемиология и инфекционные болезни.* — 2002. — № 2. — С. 43—47.
14. Обнаружение калицивирусов человека на территории Н. Новгорода / Л. Б. Луковникова и др. // *Сб. трудов V Всеросс. НПК «Генодиагностика Инфекционных Болезней».* — М., 2004. — Том II. — С. 60—61.
15. Острые кишечные инфекции у детей (диагностика, классификация, лечение) / В. Ф. Учайкин, Л. Н. Мазанкова, А. А. Новокшионов, Н. В. Соколова // *Пособие для врачей.* — Москва, 2003. — 34 с.