

Изучение этиологии острых кишечных инфекций у детей, госпитализированных в инфекционные отделения стационаров Москвы

А.Т.Подколзин¹, А.А.Мухина¹, Г.А.Шипулин¹, В.Н.Кузьмина¹, С.И.Браславская¹, В.В.Малеев¹, А.В.Горелов¹, Н.В.Белова², А.Г.Боковой³, Н.Б.Танина³, А.А.Новокшионов⁴, Н.В.Соколова⁴, Л.Н.Мазанкова⁵, Н.О.Ильина⁵, С.В.Шишкина⁶, Г.Ю.Яковлева⁶

¹Центральный НИИ эпидемиологии Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Москва;

²Детская инфекционная больница №5, Москва;

³Центральная клиническая больница Управления делами Президента РФ, Москва;

⁴Российский государственный медицинский университет, Москва;

⁵Российская медицинская академия последиplomного образования, Москва;

⁶Тушинская детская клиническая больница, Москва

Обследовано 2043 детей с острыми кишечными инфекциями (ОКИ), госпитализированных в инфекционные стационары Москвы. Исследование проводилось с сентября 2002 по сентябрь 2004 г. Возбудители кишечных инфекций выявлялись методом полимеразной цепной реакции с использованием тест-систем и методик, разработанных в Центральном НИИ эпидемиологии Министерства здравоохранения и социального развития РФ. Скрининговое тестирование включало определение ротавирусов групп А и С, норовирусов 1-го и 2-го генотипов, астро- и аденовирусов, микроорганизмов рода сальмонелла, шигелла и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC). Все отрицательные по наличию указанных возбудителей пробы дополнительно исследовались на наличие саповирусов, энтеротоксигенных и энтероагрегативных *E. coli*. Комплекс использованных диагностических методик позволил установить этиологию острых кишечных инфекций при спорадической заболеваемости у 81% госпитализированных пациентов. В ходе работы удалось выявить особенности этиологической структуры этой группы заболеваний в различные сезоны в течение года в разных возрастных группах детей.

Ключевые слова: острые кишечные инфекции, возбудители, спорадическая заболеваемость, дети

Study of etiology of acute enteric infections in children admitted to the infectious departments of Moscow hospitals

A.T.Podkolzin¹, A.A.Mu hina¹, G.A.Shipulin¹, V.N.Kuz'mina¹, S.I.Braslavskaya¹, V.V.Maleev¹, A.V.Gorelov¹, N.V.Belova², A.G.Bokovoy³, N.B.Tanina³, A.A.Novokshonov⁴, N.V.Sokolova⁴, L.N.Mazankova⁵, N.O.Ilyna⁵, S.V.Shishkina⁶, G.Y.Yakovleva⁶

¹Central Research Institute of Epidemiology of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation;

²Children's Infectious Diseases Hospital No 5, Moscow;

³Central Clinical Hospital of the General Management Department of the President of the Russian Federation, Moscow;

⁴Russian State Medical University, Moscow;

⁵Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow;

⁶Tushino Children's Clinical Hospital, Moscow

2043 children admitted to the infectious departments of Moscow hospitals with acute enteric infections (AEI) were observed from September 2002 to September 2004. Enteric pathogens were detected by the method of polymerase chain reaction with the help of test systems and techniques elaborated by the Central Research Institute of Epidemiology of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation. The screening test included determination of rotaviruses of group A and C, noroviruses of first and second genotypes, astro- and adenoviruses, microorganisms from salmonella, shigella and enteroinvasive *E. coli* (EIEC) genus. All negative tests, in which indicated agents were not detected, were additionally studied for presence of sapoviruses, enterotoxigenic and enteroaggregative *E. coli*. The complex of used diagnostic methods allowed determining etiology of acute enteric infections under sporadic morbidity in 81% of admitted patients. The features of etiological structure of this group of diseases in deferent seasons during a year in various age groups of children have been revealed in the course of the study.

Key words: acute enteric infections, pathogens, sporadic morbidity, children

По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире около 2 млрд. человек переносят острые кишечные инфекции (ОКИ). Среди причин летальности, связанных с инфекционной патологией, эта группа заболеваний стойко занимает второе-третье место после заболеваний верхних дыхательных путей и ВИЧ-инфекции. При этом заболеваемость кишечными инфекциями у детей в возрасте до 14 лет в несколько раз выше, чем у взрослых, и основная масса летальных исходов также наблюдается именно в этой возрастной группе [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения, в 2003 г. ОКИ занимали третье место среди причин детской смертности, обуславливая 15,2% всех ее случаев. Наряду с этим диагностика данных заболеваний сталкивается с большими трудностями. В соответствии с официальной статистикой федерального Центра Госсанэпиднадзора РФ, в период с 2000 по 2003 г. этиология ОКИ была установлена только у 25–35% пациентов. Причем расшифровка этих заболеваний у детей была менее эффективна, чем у взрослых. В то же время в большом количестве зарубежных публикаций достигается несравненно более высокая эффективность этиологической верификации ОКИ [2–4]. Приведенные данные свидетельствуют о безусловной необходимости разработки новых эффективных диагностических инструментов и оптимизации алгоритма диагностики заболеваний этой группы. Одним из перспективных диагностических методов, прочно завоевавшим свои позиции как в научно-исследовательских лабораториях, так и на рынке коммерчески доступных тест-систем, является метод детекции нуклеиновых кислот возбудителей с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Наряду с высоким потенциалом реализации хороших аналитических характеристик тест-системам для ПЦР диагностики свойственна универсальность, облегчающая выявление самого широкого спектра возбудителей.

На базе Центрального НИИ эпидемиологии Министерства здравоохранения и социального развития РФ в течение ряда лет проводилась разработка лабораторных методик, положенных в основу тест-систем, для диагностики возбудителей ОКИ [5–9]. Специалистами института неоднократно проводились обследования различных континентов пациентов с ОКИ, однако эти работы не давали цельной картины распространенности изучаемых возбудителей в популяции из-за небольшого количества обследованных пациентов, ограниченного спектра детектируемых возбудителей и отсутствия круглогодичного периода наблюдений [7, 10].

Перед нами стояла цель изучить вклад различных возбудителей в общую структуру спорадической заболеваемости ОКИ у детей с использованием ПЦР и оценить различия в распространенности возбудителей ОКИ в популяциях госпитализированных детей различных возрастных групп и в разные сезоны в течение года.

Для корреспонденции:

Подколзин Александр Тихонович, кандидат медицинских наук, научный сотрудник Центрального НИИ эпидемиологии Министерства здравоохранения и социального развития РФ

Адрес: 123014, Москва, ул. Новогиреевская, 3а
Телефон: (095) 304 2201

Статья поступила 15.07.2004 г., принята к печати 25.11.2004 г.

В исследование были включены дети, поступившие на госпитализацию в отделения острых кишечных инфекций инфекционных стационаров Москвы в период с 01.10.2002 по 31.09.2004 г. Всего было обследовано 2043 ребенка со спорадической заболеваемостью ОКИ. Клинические данные были доступны по 1848 пациентам. В возрастной структуре преобладали дети младшего возраста. Пациенты в возрасте до 1 года составили 35,7%, до 3 лет – 71,7%, до 5 лет – 87,3% от общего количества госпитализированных детей.

Группу сравнения составили 127 пациентов отделения гастроэнтерологии, у которых в анамнезе на протяжении 2 нед отсутствовала диарейная симптоматика и лихорадочная реакция.

Материалом для исследования служили образцы нативных фекалий, собранные в одноразовые пластиковые контейнеры в объеме 2–3 мл. Материал собирался при поступлении пациентов в отделение не позднее 3-го дня заболевания. До исследования материал сохранялся при –20°C не более 3 дней, повторное замораживание-оттаивание не допускалось. После проведения исследования материал сохранялся при –70°C.

При оценке аналитической специфичности разработанных тест-систем использовались следующие штаммы микроорганизмов:

Штамм ротавируса человека WA, штамм ротавируса обезьян SA-11, штамм ротавируса свиней и крупного рогатого скота, штаммы энтеровирусов (Coxsackie B1, B2, B3, B4, B5, B6; Polio I, II, III), любезно предоставленные Государственным НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича.

Штаммы шигелл из коллекции Центрального НИИ эпидемиологии (46 штаммов *Shigella spp.* в том числе 4 – *Sh. dysenteriae*, 2 – *Sh. boydii*, 11 – *Sh. flexneri* и 29 – *Sh. sonnei*, а также 5 штаммов *S. typhi*). Штаммы, полученные из коллекции ФГУ ВГНКИ (*Salmonella enteritidis* S-6, *S. choleraesuis* 370, *S. typhimurium* 371, *S. dublin* 373, *S. typhi* C1, *S. abortusovis* 372, *S. gallinarum-pullorum* Tn 10, *Sh. flexneri* 851b, *Campylobacter fetus subsp. fetus* 25936, *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* 43435, *Clebsiella* K 65 SW4, *Listeria monocytogenes* УСХЧ 19, *L. monocytogenes* УСХЧ 52, *Proteus vulgaris* 115/98, *Pseudomonas aeruginosa* ДН с1, *Staph. aureus* 653, *Staph. aureus* 29112, *Morganella morganii* 619 c01, *Enterobacter faecalis* 356).

Все использованные в работе штаммы микроорганизмов хранились при температуре –70°C в фосфатном буфере с добавлением криопротектора.

Для оценки специфичности разработанной нами методики также использовались образцы клинического материала, содержащего штаммы саповирусов 1-го и 2-го генотипов, норовирусов 1-го и 2-го генотипов, астро- и аденовирусов типов 40 и 41. Наличие указанных возбудителей было подтверждено методом прямого секвенирования амплифицированных фрагментов и сравнением их с изолятами из базы данных генетических последовательностей GenBank NCBI.

Бактериологическая диагностика ОКИ осуществлялась в условиях инфекционного стационара. Для проведения бактериологического исследования на шигеллез, сальмонеллез

и условно-патогенную флору использовался непосредственный посев фекалий на среду Эндо и посев через среду накопления (селенитовый бульон, инкубация 24 ч). Результаты бактериологического исследования отражали информативность суммы этих двух методов. Выделение и дифференцировка энтеробактерий проводилась по стандартной схеме [12] с идентификацией микроорганизмов рода шигелла сальмонелла в реакциях агглютинации с родовыми и групповыми агглютинирующими сыворотками производства РАО «Биопрепарат» (С.-Петербург).

У части пациентов в лабораториях инфекционных стационаров проводилась РПГА с определением титра антител к микроорганизмам рода сальмонелла, шигелла и *Y. enterocolitica*. Для проведения РПГА использовались диагностикумы производства НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского (Москва) и НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (С.-Петербург).

Выявление антигенов ротавирусов осуществлялось в стационарах с использованием двух методов: в реакции латекс-агглютинации (РЛА), а также с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Реакцию агглютинации проводили на наборах «Rotalex» производства «Orion Diagnostica» (Финляндия). Для проведения ИФА использовали иммуноферментную моноклональную тест-систему для обнаружения антигенов ротавирусов группы А «Рота-анализ» производства «Биоиммуноген» (Москва).

Исследования методом ПЦР проводились на базе Центрального НИИ эпидемиологии Министерства здравоохранения и социального развития РФ в два этапа. На первом этапе клинический материал тестировался на наличие ротавирусов группы А, норо-, астро-, аденовирусов, микроорганизмов рода шигелла и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC), сальмонелла, кампилобактер и *Y. enterocolitica*. Пробы, в которых указанные возбудители не обнаружены, дополнительно тестировались на наличие энтероагрегативных (EAEC), энтеротоксигенных (ETEC) *E. coli* и саповирусов.

Выделение нуклеиновых кислот вирусов проводилось из 50 мкл осветленных фекальных экстрактов методом аффинной сорбции на силикагеле с использованием набора для выделения «Рибо-сорб» согласно инструкции производителя (Центральный НИИ эпидемиологии Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Москва). Выделение ДНК бактериальной кишечной флоры проводилось после получения бактериальной фракции фекалий аналогичным методом с использованием набора «ДНКсорб Б» то-

го же производителя. При использовании набора «Рибо-сорб» элюция проходила в объеме 50 мкл. «ДНКсорб Б» – в 100 мкл.

Для постановки реакции обратной транскрипции использовали набор «Реверта» (производство Центрального НИИ эпидемиологии, Москва) со случайными гексамерными праймерами, согласно инструкции по применению набора. Реакция проводилась в 40 мкл, полученная кДНК разбавлялась в 3 раза ТЕ-буфером. Для амплификации нуклеиновых кислот микроорганизмов рода *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Y. enterocolitica*, норовирусов 1-го и 2-го генотипов, астро-, ротавирусов группы А и аденовирусов использовались наборы реагентов, представленные в табл. 1. Выявление нуклеиновых кислот ротавирусов группы С, саповирусов, энтеротоксигенных и энтероагрегативных *E. coli* ПЦР проводили с помощью набора «Амплисенс-200» (производство Центрального НИИ эпидемиологии, Москва) с использованием оригинальных праймеров на амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология).

Детекция продуктов амплификации осуществлялась методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле с окраской бромидом этидия и последующей регистрацией результатов системой Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

Определение нуклеотидной последовательности продуктов амплификации проводили после очистки продуктов ПЦР стандартной процедурой выделения ДНК на амплификаторе GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin-Elmer, США) и автоматическом анализаторе PRISM™ ABI-3100 Genetic Analyzer (PE/Applied Biosystems).

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программ Vector NTI Suite 6, MEGA 2.1. Нуклеотидные последовательности референтных штаммов, использованные в работе, были получены из базы данных Национального центра биотехнологической информации (Gen Bank NCBI, США).

При анализе материала от пациентов со sporadической заболеваемостью были получены следующие результаты.

Из общего числа госпитализированных детей бактериологическая диагностика шигеллеза и сальмонеллеза проводилась у 97,5% пациентов. РПГА на наличие антител к шигеллам и сальмонеллам как диагностический метод использовалась у 168 (9,1%) пациентов, причем только у 4 из них это исследование проводилось в динамике. Выявление антигенов ротавирусов осуществлялось у 174 (9,3%) человек, при этом метод РЛА использовался у 92 (4,9%), а ИФА у 82 (4,4%) из них. Метод ПЦР использовался у всех обследованных пациентов.

При проведении бактериологической диагностики шигеллез был верифицирован у 52 (2,8%) а сальмонеллез у 150 (8,1%) из 1802 пациентов. Таким образом, при использовании этого метода этиологию заболеваний удалось установить у 10,9% обследованных пациентов. У 106 пациентов при бактериологическом исследовании фекалии отметался рост таких микроорганизмов, как *St. aureus*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.* Интерпретация результатов этих исследований была затруднительна, так как при использовании других методов диагностики в материале от этих же пациентов были обнаружены другие возбудители. Результаты тестирования проб фекалий, в которых была об-

Таблица 1. Наборы реагентов производства ГУ Центрального НИИ эпидемиологии Министерства здравоохранения и социального развития РФ, использованные в работе

Название набора	Выявляемые возбудители
АмплиСенс <i>Salmonella spp.</i>	Микроорганизмы рода <i>Salmonella</i>
АмплиСенс <i>Shigella spp.</i>	Комплекс микроорганизмов рода <i>Shigella</i> и EIEC
АмплиСенс <i>Campylobacter spp.</i>	Термофильная группа микроорганизмов рода <i>Campylobacter</i>
АмплиСенс <i>Yersinia enterocolitica</i>	Вирулентные штаммы <i>Y. enterocolitica</i>
АмплиСенс Ротавирусы	Ротавирусы группы А
АмплиСенс Калицивирусы:	Норовирусы человека
Норовирусы 1-го и 2-го типов	1-го и 2-го генотипов (выявление и дифференцировка)
АмплиСенс Астровирусы	Астровирусы человека
АмплиСенс Аденовирусы	Аденовирусы человека

Таблица 2. Результаты тестирования методом ПЦР проб, в которых при бактериологическом исследовании обнаруживалась условно-патогенная флора

	Результаты тестирования материала методом ПЦР										
	ротавирусы	норовирусы	астровирусы	аденовирусы	Shigella + EIEC	Salmonella	Campylobacter	Y. enterocolitica	EAEC и ETEC	более 1 возбудителя	отрицательный результат
<i>St. aureus</i> (n = 63)	20	13	3	4	2	1	3	1	3	6	19
<i>Klebsiella spp.</i> (n = 22)	5	4	1	3	0	0	1	1	0	3	10
<i>Proteus spp.</i> (n = 12)	4	4	1	0	1	2	0	0	0	3	3
<i>Pseudomonas spp.</i> (n = 9)	2	1	0	0	1	0	1	0	1	0	3

наружена условно-патогенная флора методом ПЦР, представлены в табл. 2.

Примечательные результаты были получены при использовании РПГА для серологической диагностики шигеллеза и сальмонеллеза. Титры антител к сальмонеллам были найдены у 17 детей, к шигеллам – у 30. Соотношение результатов серологической диагностики и прямых методов выявления возбудителей представлено в табл. 3. У 4 пациентов, которые обследовались методом РПГА в динамике, результаты исследования были отрицательными.

При определении антигенов ротавирусов группы А в фекалиях методом РЛА было выявлено 20 положительных образцов, а при использовании ИФА – 18. Результаты исследо-

Таблица 3. Соотношение результатов серологической диагностики шигеллеза (РПГА) и сальмонеллеза с результатами прямых методов выявления возбудителей

Результат РПГА	Число положительных результатов РПГА	Число бактериологически подтвержденных результатов РПГА	Число результатов РПГА, подтвержденных методом ПЦР	Другие возбудители, обнаруженные методом ПЦР у пациентов с положительными результатами РПГА (с указанием количества положительных образцов)
Sal 1 : 50	2	1	1	
Sal 1 : 100	2	2	2	N (I) – 1
Sal 1 : 200	6	2	3	RotaA – 3, N (II) – 1, Shig – 1
Sal 1 : 400	1	0	0	RotaA – 1
Sal 1 : 800	6	3	2	RotaA – 1, Sh – 2
Shig 1 : 50	3	0	0	RotaA – 1, Y ent – 1, Cam – 1
Shig 1 : 100	2	0	1	Cam – 1, ETEC – 1
Shig 1 : 200	11	0	1	RotaA – 5, N (II) – 3, Sal – 4, Ast – 1, EAEC – 1
Shig 1 : 400	8	0	3	RotaA – 5, N (II) – 1, Ad – 2, Cam – 1
Shig 1 : 800	6	1	6	Ad – 2

Таблица 4. Сравнение результатов выявления антигенов ротавирусов группы А с обнаружением РНК ротавируса методом ПЦР

	РЛА		ИФА	
	+	-	+	-
ПЦР +	20	23	14	41
ПЦР -	0	49	4	23

вания 174 проб фекалий, в которых определялись антигены ротавирусов группы А и которые тестировались методом ПЦР, представлены в табл. 4.

При использовании метода ПЦР у 932 (50,4%) пациентов были выявлены вирусные моноинфекции, у 290 (15,7%) моноинфекции бактериальной этиологии, у 274 (14,8%) пациентов обнаруживались два возбудителя и более и у 352 (19%) детей этиологию кишечной инфекции установить не удалось. При моноинфекциях ротавирусы группы А были выявлены у 594 (32,1%) пациентов, норовирусы – у 220 (11,9%), аденовирусы – у 79 (4,3%), астровирусы – у 24 (1,3%), ротавирусы группы С – у 11 (0,6%), саповирусы – у 4 (0,2%). Среди бактериальных агентов, вызывавших моноинфекции с наибольшей частотой, в 93 (5%) случаях выявлялись сальмонеллы, комплекс шигелл и энтероинвазивных эшерихий был обнаружен у 75 (4,1%) пациентов, энтероагрегативные эшерихии – у 55 (3%), представители термофильной группы микроорганизмов рода *Campylobacter* – у 53 (2,9%) детей. Возбудители кишечного иерсиниоза и энтеротоксигенные эшерихии выявлялись соответственно у 8 (0,4%) и 6 (0,3%) пациентов.

У 274 (14,8%) пациентов выявлялись кишечные инфекции сочетанной этиологии с обнаружением двух возбудителей и более. При этом сочетание нескольких вирусных возбудителей было отмечено у 170 (9,2%) детей, а вирусных и бактериальных агентов – у 120 (6,5%). Одновременное присутствие в пробах двух бактериальных агентов отмечалось редко – в 9 (0,5%) случаях. Частота выявления различных возбудителей у пациентов с моноинфекциями и инфекциями сочетанной этиологии представлена в табл. 5.

У части пациентов исследовали фекалии в динамике заболевания. При этом отмечалась выраженная зависимость частоты выявляемых инфекций сочетанной этиологии от

Таблица 5. Частота выявления (в %) различных возбудителей у пациентов с острыми кишечными моноинфекциями и инфекциями сочетанной этиологии

	Общая частота выявления	В составе моноинфекций	В составе инфекций сочетанной этиологии
Ротавирусы группы А	41,3	32,1	9,1
Норовирусы 2-го генотипа	18,8	11,5	7,3
Аденовирусы	10,2	4,3	6,0
Сальмонеллы	7,7	5,0	2,7
Шигеллы и EIEC	5,4	4,1	1,3
Кампилобактеры	5,1	2,9	2,3
EAEC*	3,6	3,0	0,6
Астровирусы	3,4	1,3	2,1
<i>Y. enterocolitica</i>	0,9	0,4	0,5
Ротавирусы группы С	0,9	0,6	0,3
Норовирусы 1-го генотипа	0,8	0,4	0,4
ETEC*	0,5	0,3	0,2
Саповирусы*	0,4	0,2	0,2

*Выявленные при втором раунде тестирования проб с неясной этиологией (истинный процент вхождения в состав инфекций сочетанной этиологии выше).

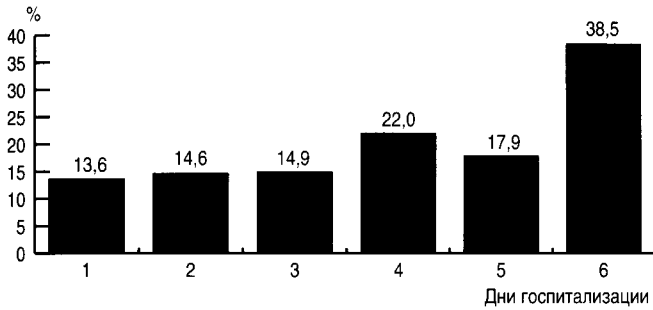


Рисунок. Изменение частоты выявлявшихся кишечных инфекций сочетанной этиологии в зависимости от длительности пребывания ребенка в инфекционном стационаре.

сроков госпитализации. На протяжении первых 6 дней пребывания ребенка в стационаре доля кишечных инфекций сочетанной этиологии последовательно возрастала с 13,6 до 38,5%. Изменение частоты выявлявшихся кишечных инфекций сочетанной этиологии представлено на рисунке.

Сравнение результатов использования бактериологической диагностики шигеллеза и сальмонеллеза и выявления этих микроорганизмов методом ПЦР проводилось на материале от 1802 детей, который тестировался двумя названными методами.

При диагностике сальмонеллеза совпадение результатов было получено в 89 случаях, в 60 возбудитель был выявлен только методом ПЦР и в 62 только в ходе микробиологического исследования.

Совпадение результатов при диагностике шигеллеза наблюдалось в 46 случаях, в 54 возбудитель был выявлен только методом ПЦР и в 5 только при бактериологическом исследовании.

Вклад различных возбудителей в общую заболеваемость ОКИ был подвержен значительным колебаниям в зависимости от сезона наблюдений. Частота выявления различных возбудителей ОКИ в разные сезоны представлена в табл. 6.

В разных возрастных группах детей изучавшиеся возбудители встречались с различной частотой. Данные о распространенности возбудителей кишечных инфекций у детей в возрасте до 5 и от 8 до 14 лет представлены в табл. 7.

При исследовании проб фекалий от 127 пациентов, составивших группу сравнения, у 86 человек изучавшиеся возбудители не выявлялись. У 15 детей были обнаружены ЕАЕС, у 9 – аденовирусы, у 8 – норовирусы 2-го генотипа, у 3 – астровирусы и у 1 ребенка – сальмонелла. В 5 случаях имело

место сочетание нескольких возбудителей. К сожалению, в ходе работы были получены данные о высоких темпах внутрибольничного инфицирования детей в отделениях кишечных инфекций. Учитывая этот факт, формирование группы сравнения из детей, госпитализированных в неинфекционные отделения многопрофильных стационаров, имеющих в своем составе инфекционные отделения, могло дать искаженное представление о распространенности изучаемых возбудителей.

Анализ полученного материала в очередной раз подтверждает, что наиболее широко распространенным методом лабораторной диагностики ОКИ в условиях стационаров является бактериологическое выявление микроорганизмов семейства энтеробактерий. При этом используемые алгоритмы диагностики приводят к обнаружению возбудителей, чья патогенность не вызывает сомнений, только у 10,9% пациентов. Наблюдающийся при этом высев *St. aureus*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.* часто сочетается с обнаружением в пробах фекалий таких безусловных патогенов, как ротавирусы, норовирусы, шигеллы и ЕИЕС, сальмонеллы и др. Этот факт свидетельствует о необходимости крайне осторожной интерпретации значения высева условно-патогенной флоры, особенно в условиях невозможности определения широкого спектра возбудителей. На практике наблюдается прямо противоположная картина: стационары, в клинко-диагностических лабораториях которых имеется скудный арсенал диагностических методик, с наибольшей частотой интерпретируют результаты высева условно-патогенной флоры в пользу диагноза пищевой токсикоинфекции, вызванной данным возбудителем.

Для пациентов с ОКИ характерны очень короткие сроки госпитализации. В нашем исследовании пациенты с неосложненным течением заболевания находились в стационаре в среднем 6 дней. В таких условиях исследование парных сывороток в РПГА является крайне затруднительным. В то же время полученные результаты свидетельствуют о крайне низкой информативности однократного определения титров антител для постановки диагноза шигеллеза или сальмонеллеза. Вероятно, целесообразным является более четкое выделение групп пациентов с длительным течением заболевания и неинформативностью прямых тестов выявления возбудителей для определения титров диагностических антител в динамике, что позволит получить ценные для диагностического заключения результаты.

Выявление антигенов ротавирусов группы А в нашей работе показало более низкую эффективность, чем использо-

Таблица 6. Частота выявления (в %) различных возбудителей ОКИ в разные сезоны

Возбудители	Осень	Зима	Весна	Лето
Ротавирусы	17	59	58	15
Калицивирусы	24	15	8	3
Астровирусы	2	1	1	1
Аденовирусы	7	3	3	5
Сумма вирусных агентов	50	78	70	24
Шигеллы + ЕИЕС	10	2	1	7
Сальмонеллы	4	4	6	10
Кампилобактеры	4	3	1	9
ЕАЕС	5	1	4	6
Сумма бактериальных агентов	23	9	13	31
Сумма бактериальных и вирусных агентов	73	87	83	55
КИНЭ	27	13	17	45

Таблица 7. Распространенность возбудителей ОКИ в различных возрастных группах детей

Возбудители	Дети до 5 лет (n = 1613)	Дети 8–14 лет (n = 156)	Достоверность различий (тест Фишера), p
Ротавирусы	45,9	12,2	0,000
Калицивирусы	12,3	28,1	0,000
Аденовирусы	4,9	6,5	0,440
Астровирусы	0,8	6,5	0,000
Шигеллы	2,8	10,8	0,000
Сальмонеллы	6,9	3,9	0,177
Кампилобактеры	4,2	1,0	0,083
ЕАЕС	4,2	3,0	0,676
Кишечные инфекции неустановленной этиологии	18,2	27,6	0,007

вание ПЦР. К сожалению, приходится констатировать факт необоснованно редкого назначения этих исследований в стационарах. В предшествующих работах не было выявлено существенного влияния на диагностическую чувствительность различий между аналитической чувствительностью ИФА и ПЦР тест-систем [5]. Эти различия нивелируются высокой концентрацией ротавирусов в клиническом материале. Наблюдаемые нами различия в информативности применения ИФА и ПЦР тест-систем, выявленные в настоящей работе, требуют дополнительного изучения. Другим результатом работы явилось установление распространенности ротавирусов группы С, которые потенциально не могут быть диагностированы коммерческими тест-системами для выявления антигенов ротавирусов группы А.

Наиболее полное представление об этиологической структуре ОКИ в нашей работе было получено при использовании ПЦР. Доминирующей группой возбудителей ОКИ явились вирусные агенты. Они были обнаружены у 64,7% обследованных детей с моноинфекциями и инфекциями сочетанной этиологии. Бактериальные возбудители обнаружены у 22,7% пациентов. Наиболее часто среди детей с моноинфекциями выявлялись ротавирусы группы А (32,1%), норовирусы 2-го генотипа (11,5%) и сальмонеллы (5%). Меньшее распространение имели аденовирусы (4,3%), шигеллы и EIEC (4,1%), EAEC (3%), кампилобактеры (2,9%) и астровирусы (1,3%). К редко выявляемым возбудителям ОКИ можно отнести ротавирусы группы С (0,6%), *Y. enterocolitica* (0,4%), норовирусы 1-го генотипа (0,4%), ETEC (0,3%) и саповирусы (0,2%). Таким образом, использование тест-систем для детекции микроорганизмов первой группы позволяло установить этиологию моноинфекций в 48,6%, второй группы – в 15,6% и третьей группы в 1,9% случаев. Пропорциональным являлся вклад этих возбудителей и в состав инфекций сочетанной этиологии.

В настоящей работе был выявлен высокий процент кишечных инфекций сочетанной этиологии. Можно выделить две основные причины их возникновения. Во-первых, это суперинфицирование, произошедшее до госпитализации в стационар. В этом случае высока вероятность вхождения в состав инфицирующих агентов возбудителя, склонного к длительной персистенции, на фоне которой развивается суперинфекция. Во-вторых, это суперинфицирование в условиях стационара, при этом в составе инфицирующих агентов высока вероятность участия высококонтагиозных возбудителей с коротким инкубационным периодом. Условия для одновременного инфицирования несколькими возбудителями на практике реализуются достаточно редко. При сравнении частоты вхождения возбудителей в состав инфекций сочетанной этиологии в первые 2 дня госпитализации ($n = 175$) и после 3-го дня ($n = 50$), отмечается возрастание доли ротавирусов (56–74%) и норовирусов (53,1–58,0%). Частота выявления бактериальных возбудителей и астровирусов существенно не изменяется (астровирусы 13,1–12,0%, шигеллы, EIEC 6,9–8,0%, сальмонеллы 17,7–16,0% и кампилобактеры 13,7–12,0%). В то же время значительно снижается частота выявления аденовирусов (42,9–16,0%). Эти данные косвенно свидетельствуют о преобладающей роли рота- и норовирусов в развитии внутрибольничной заболеваемости ОКИ у детей.

Двумя наиболее распространенными диагностическими методами, использовавшимися в работе, были бактериологическая и ПЦР диагностика шигеллеза и сальмонеллеза. В тест-системе «АмплиСенс *Shigella sp.*» реализована возможность выявления комплекса микроорганизмов рода шигелла и энтероинвазивных *E. coli*. Дифференцировки между данными возбудителями при этом не проводится из-за идентичности клинических проявлений вызываемых ими заболеваний и эволюционного родства микроорганизмов. Вероятно, более высокая частота обнаружения положительных проб при использовании ПЦР объясняется наличием в пробах EIEC, не детектируемых при стандартном проведении бактериологических исследований.

При диагностике сальмонеллеза наблюдалось большое количество дискордантных результатов исследований. Продукты амплификации, полученные на пробах фекалий от пациентов с отрицательными результатами бактериологического исследования, были исследованы методом прямого секвенирования. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с представленными в Gen Bank (NCBI) доказало наличие ДНК сальмонелл в этих образцах. Пробы фекалий, давшие отрицательный результат при тестировании на наличие ДНК сальмонелл от пациентов, у которых бактериологически выявлялся сальмонеллез, были подвергнуты более внимательному изучению. Применение вложенной ПЦР, как высокочувствительного метода детекции, позволило выявить среди 18 из этих образцов еще 5 (27,7%) положительных находок. Однако это не привело к существенному снижению количества дискордантных образцов. В предыдущих работах нами была дана оценка эффективности применения ПЦР для диагностики сальмонеллеза у взрослых пациентов. Показатели диагностической чувствительности и специфичности при использовании в качестве золотого стандарта бактериологической диагностики составляли соответственно 90,9 и 84,4% [9]. Выявленные в ходе данной работы различия между информативностью ПЦР и бактериологического исследования в диагностике сальмонеллеза у детей требуют более детального изучения с тестированием выделенных штаммов микроорганизмов и определением гетерогенности распределения сальмонелл в различных образцах фекалий от одного пациента.

Анализ сезонных различий в заболеваемости ОКИ показывает безусловное доминирование вирусных агентов во все сезоны на протяжении года. Ротавирусы лидировали по частоте выявления в зимние и весенние месяцы. Наиболее часто выявляемыми возбудителями в осенние месяцы были норовирусы, обуславливавшие до 1/4 всех случаев кишечных инфекций, зарегистрированных в это время. Практически для всех кишечных инфекций бактериальной этиологии была характерна летне-осенняя сезонность. Заболеваемость адено- и астровирусной инфекцией была подвержена менее значительным колебаниям на протяжении года. Возрастание доли кишечных инфекций неустановленной этиологии в летнее время связано, вероятно, с увеличением количества пищевых токсикоинфекций, вызванных условно-патогенной флорой, а также с возрастанием частоты эшерихиозов, вызванных энтеропатогенными *E. coli*.

Вклад различных возбудителей в заболеваемость ОКИ сильно зависел от возраста пациентов. У детей старших

возрастных групп значительно снижался процент выявления ротавирусов ($p < 0,00$, тест Фишера) и возрастала частота обнаружения норовирусов ($p < 0,00$, тест Фишера), астровирусов ($p < 0,00$, тест Фишера) и дизентериеподобных заболеваний ($p < 0,00$, тест Фишера). Также с увеличением возраста у детей возрастала доля кишечных инфекций неустановленной этиологии ($p = 0,007$, тест Фишера).

Достаточно сложной является оценка диагностической значимости выявления различных возбудителей в клиническом материале. Правильной интерпретации результатов таких исследований может помочь изучение распространенности этих микроорганизмов в популяции здоровых лиц. Частота выявления аденовирусов и энтероагрегативных *E. coli* в группе сравнения в нашей работе была даже выше, чем среди пациентов с ОКИ. Правильную оценку результатов таких лабораторных исследований при анализе материала от пациентов со sporadической заболеваемостью необходимо проводить с учетом клинической симптоматики у обследуемых детей.

Выводы

1. Использование ПЦР исследований оказалось значительно более эффективным подходом к диагностике ОКИ у детей, чем традиционно используемый комплекс диагностических подходов, и привело к расшифровке их этиологии у 81% госпитализированных детей.

2. Учитывая вклад различных возбудителей в заболеваемость ОКИ у детей можно рекомендовать для более широкого практического применения тест-системы для выявления ротавирусов группы А и норовирусов 2-го генотипа. Использование только этих двух тест-систем позволило верифицировать этиологию заболеваний у 57,9% госпитализированных детей (с учетом вхождения этих возбудителей в состав инфекций сочетанной этиологии). Наряду с ними высокоинформативным, на наш взгляд, является применение ПЦР тест-систем для выявления шигелл и EIEC, сальмонелл и микроорганизмов рода кампилобактер. Интерпретация положительных результатов тестирования материала от детей на наличие аденовирусов и энтероагрегативных *E. coli* при sporadической заболеваемости должна проводиться с осторожностью из-за высокого процента носительства этих возбудителей в популяции здоровых детей.

3. При построении оптимальных диагностических алгоритмов необходимо учитывать смену доминирующих возбудителей в течение года. В осенний сезон отмечается преобладание норовирусов, в зимне-весенний – ротавирусов. При обследовании детей старших возрастных групп, которые составляют меньшую часть госпитализированных паци-

ентов, необходимо учитывать снижение частоты выявления у них ротавирусов ($p < 0,00$, тест Фишера) и возрастание доли норо- ($p < 0,00$, тест Фишера), астровирусов ($p < 0,00$, тест Фишера), а также возбудителей дизентериеподобных заболеваний ($p < 0,00$, тест Фишера).

Литература

1. The World Health Report 2003: Shaping the Future. Geneva WHO 2003
2. Bon F., Dauvergne M., Tenenbaum D., et al. Prevalence of group A Rotavirus, Human Calicivirus, Astrovirus, and Adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3055–8.
3. Inoue S., Yamashita K., Yamadera S., et al. Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. *JID* 2000; 181(2): 270–4.
4. Etiology of Gastroenteritis in Sentinel General Practices in The Netherlands. M. de Wit, M. Koopmans, et al. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 280–8.
5. Мухина А.А., Шипулин Г.А., Боковой А.Г., Евреинова Е.Э., Шипулина О.Ю. Диагностика ротавирусной инфекции методом полимеразной цепной реакции. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2002; 2.
6. Mukhina A.A., Shipulin G.A., Bokovoi A.G., Platonov A.E. Detection of rotavirus in stool and saliva samples in patients with acute gastroenteritis and the common cold. 101 General meeting of American Society for microbiology. Orlando. May 20–24, 2001, 250–1.
7. Мухина А.А., Шипулин Г.А., Боковой А.Г., Яцышина С.Б. Первый опыт изучения калицивирусной инфекции у детей в Москве. *Материалы VIII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов* 2002; 2: 115.
8. Подколзин А.Т., Яцышина С.Б., Свистунова Т.С., Белошицкий Г.В. и др. Разработка диагностической тест-системы для детекции микроорганизмов родов *Salmonella*, *Shigella* и энтероинвазивных *E. coli* на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции. *Тезисы докладов IV Всероссийской научно-практической конференции (Москва, 22–24 октября 2002)*. Тверь: ПБОЮЛ Новиков В.В. 2002. 236.
9. Подколзин А.Т., Яцышина С.Б., Свистунова Т.С., Белошицкий Г.В. и др. Изучение чувствительности и специфичности диагностической ПЦР тест-систем для выявления микроорганизмов рода *Salmonella*. *Тезисы докладов IV Всероссийской научно-практической конференции (Москва, 22–24 октября 2002)*. Тверь: ПБОЮЛ Новиков В.В. 2002. 240.
10. Мухина А.А., Шипулин Г.А., Боковой А.Г., Яцышина С.Б. Этиологическая расшифровка вирусных диарей у детей. *Материалы VIII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов* 2002. 2: 114.
11. Mukhina A., Shipulin G., Yatchishina S. Genetic heterogeneity of calicivirus infection in Moscow, Russia. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8(1): 310.
12. Министерство здравоохранения СССР. Приказ 22 апреля 1985 г. № 535. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений.