

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДА ПЦР В ВЕРИФИКАЦИИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА И ШИГЕЛЛЕЗА ПО СРАВНЕНИЮ С РУТИННЫМИ МЕТОДАМИ ДИАГНОСТИКИ

Айвазян С.Р., Малов В.А., Дмитриева Л.Н., Шмавонян М.В., Атоян Л.Ф. (Москва)

На фоне сохраняющегося высокого уровня заболеваемости острыми кишечными инфекциями (ОКИ) одной из актуальных проблем остаётся низкий уровень их этиологической расшифровки. В 65-80% случаев этиология ОКИ остается неуточненной (Покровский В.И., 1989; Малеев В.В., 2003; Онищенко Г.Г., 2005), что является причиной диагностических ошибок и недифференциального подхода к проведению лечебных и противоэпидемических мероприятий, поэтому несомненна необходимость совершенствования лабораторной диагностики ОКИ с использованием более новых и высокочувствительных методов, к числу которых относится полимеразная цепная реакция (ПЦР).

**Цель** настоящей работы – изучение диагностических возможностей ПЦР в верификации сальмонеллеза и шигеллеза по сравнению со стандартными бактериологическими и серологическими методами исследования.

**Материалы и методы.** Под наблюдением находились 119 пациентов, поступивших с диагнозом ОКИ в период с 2006 по 2007 г. включительно в 11 инфекционное отделение ГКБ № 4 г. Москвы и в 5 отделение ИКБ «Норк» г. Еревана (88 и 31 человек соответственно), из которых мужчин было 48 (40,3%), женщин – 71 (59,7%). Возраст обследованных больных варьировал в пределах от 16 до 80 лет. Определение степени тяжести ОКИ проводили согласно разработанным клинико-диагностическим критериям в зависимости от установленной нозологии (Покровский В.И. и соавт., 2005).

Клинический диагноз устанавливали на основании клинико-диагностических и эпидемиологических данных, результатов лабораторных исследований, включавших бактериологические и серологические (РНГА с шигелл-зными и сальмонеллезными диагностикумами) анализы. Кроме этого, с целью диагностики сальмонеллеза и шигеллеза исследовали копрофильтраты наблюдаемых пациентов методом ПЦР. Выделение ДНК проводили комплектом «АмплиСенс»-ДНК-сорб-В (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Амплификация всех полученных проб проведена на наборах «АмплиСенс Salmonella sp.», «АмплиСенс Shigella sp., EIES» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) по программе фирмы-производителя, с использованием амплификатора «Терцик», ДНК-технологии, (Россия). Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом гель-электрофореза.

**Результаты.** По результатам стандартных бактериологических исследований гастроинтестинальная форма сальмонеллеза диагностирована у 31 пациента (26,1%), шигеллез – у 9 (7,6%) больных. Таким образом, использование в клинической практике стандартные методы верификации диагноза позволили установить этиологию заболевания у 40 (33,7%) из наблюдаемых пациентов, тогда как в остальных 79 случаях (66,3%) этиология заболевания осталась неуточнённой.

Использование метода ПЦР показало полное подтверждение положительных результатов бактериологических и серологических исследований. Кроме этого, в группе больных с неуточнённым диагнозом были обнаружены ДНК *Salmonella sp.* в копрофильтратах ещё у 2 пациентов, ДНК гена инвазина *Shigella sp.* ещё у 5 пациентов, что позволило увеличить число верифицированных случаев сальмонеллеза и шигеллеза до 47 (39,5%).

**Заключение.** Использование более высокочувствительного и специфичного метода ПЦР позволяет повысить процент верификации сальмонеллезов и шигеллезов, что может способствовать более широкому использованию данного метода в клинической практике наряду с рутинными бактериологическими и серологическими методами диагностики кишечных инфекций.

## РОЛЬ САПОВИРУСОВ В ЭТИОЛОГИИ ДИАРЕЙНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ВЗРОСЛЫХ

Сагалова О.И., Подколзин А.Т., Абрамычева Н.Ю., Малеев В.В.  
(Челябинск, Москва)

В последние годы возрастает интерес к вирусам-возбудителям диарейных заболеваний у детей и взрослых. Главной причиной такого интереса является высокий удельный вес заболеваний нерасшифрованной этиологии в структуре острых кишечных инфекций как у детей, так и у взрослых. Кроме того, в последние годы отмечается тенденция

к снижению роли бактериальных инфекций, по крайней мере, в отдельных регионах. В то же время исследования последних лет с применением молекулярных методов диагностики доказали существенный вклад рота-, калици-, астро-, аденовирусов, а также вирусов *Aichi* в возникновение диарейных заболеваний человека [1-3]. На сегодняшний день установлено, что у детей основным этиологическим агентом диареи являются ротавирусы (РВ), в то время как у взрослых в развитых странах большую часть вспышек острого гастроэнтерита (ОГЭ) вызывают норовирусы (НВ), принадлежащие к семейству *Caliciviridae*. Представители данного рода могут быть причиной не только эпидемической, но и спорадической заболеваемости у взрослых и детей [4]. Вторым патогенным для человека родом семейства *Caliciviridae* являются саповирусы (СВ), которые в сравнении с норовирусами характеризуются более высокой консервативностью генома и, по современным представлениям, имеют меньшее значение в патологии человека нежели норовирусы [4-6]. Согласно современной классификации выделяют три генотипа саповирусов 01-03 [5]. Для человека патогенными являются представители первого и второго генотипов (01 и 02) [6].

До 2002 года саповирусы называли Саппоро-подобными вирусами (*Sapporo-like viruses*, или *SLV3*) по месту их первоначальной идентификации: прототип возбудителя был впервые идентифицирован в Японии Chiba S. et al. в 1977 году во время вспышки ОГЭ в детском доме в Саппоро [7]. В течение последующих 5 лет в этом же детском доме саповирусы вызвали еще 3 вспышки ОГЭ. В дальнейшем было показано повсеместное распространение саповирусов. Возбудители данной группы были причиной как спорадической, так и групповой заболеваемости в Японии, США, Африке, Саудовской Аравии, Китае, Юго-Восточной Азии, Финляндии, Дании и Австралии [6-10]. СВ нередко вызывают ОГЭ у детей раннего возраста, но в то же время отмечается, что для саповирусной инфекции нехарактерно тяжелое течение заболевания, соответственно, пациенты редко госпитализируются. При саповирусной инфекции реализуются все пути передачи, характерные для фекально-орального механизма заражения. Источником инфекции является больной человек или вирусоноситель. В то же время следует отметить, что СВ гораздо реже, нежели норовирусы являются причиной пищевых вспышек ОГЭ [6]. Так же, как и норовирусы, СВ могут быть причиной нозокомиальных инфекций как у детей, так и у взрослых [4]. Спектр клинических проявлений саповирусной инфекции многообразен – от транзиторного вирусывыделения до отдельных тяжелых случаев течения инфекционного процесса [5].

В России в течение последних лет изучается вклад вирусов в этиологическую структуру ОКИ. В первую очередь это относится к ротавирусам группы А, норо-, астро- и аденовирусам. О вкладе СВ в патологию человека в РФ на сегодняшний день известно мало. Так, Подколзин А.Т. и соавт. (2004), изучая этиологию ОКИ у детей в московских инфекционных стационарах в 2002-2004 гг., обнаружили СВ всего в 0,2% [2]. В то же время в доступной литературе отсутствуют сведения о распространенности в РФ СВ у взрослых больных спорадическими кишечными инфекциями.

**Целью** настоящей работы было оценить вклад СВ в этиологическую структуру спорадической заболеваемости ОКИ у взрослых, госпитализированных в инфекционное отделение.

**Материалы и методы.** В исследование включены 753 больных ОКИ в возрасте 15-90 лет, госпитализированных в инфекционное отделение ГОУ ВПО «Клиника Челябинской государственной медицинской академии Росздрави» (Клиника ЧелГМА), г. Челябинск, в период с 01.03.2005 г. по 28.02.2006 г. Критерием включения был спорадический характер заболевания ОКИ.

Стандартный алгоритм обследования всех больных включал общеклинические и биохимические исследования, копроскопию, а также двухкратное бактериологическое исследование фекалий для выявления шигелл, сальмонелл, условно-патогенной микрофлоры. У больных с синдромом гастроэнтерита обследование дополняли однократным исследованием испражнений методом иммуноферментного анализа (ИФА) на ротавирусный антиген (РвАг) с применением тест-систем «Рота-антиген» (Аквапаст, Санкт-Петербург). По показаниям назначали бактериологическое исследование промывных вод желудка, а также исследования фекалий для идентификации иерсиний и кампилобактерий. У больных с отрицательными результатами бактериологических исследований дополнительно методом РПГА изучали парные сыворотки с целью выявления антител к шигеллам Флекснера и Зонне, микроорганизмам момента госпитализации собирали и замораживали образцы фекалий для дальнейшего их исследования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) во ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва.

Методом ПЦР материал тестировали на наличие РВ гр А, норовирусов первого и второго генотипа (С1 и 02), астро-, аденовирусов, а также возбудителей бактериальной природы (шигеллы, сальмонеллы и кампилобактерий). Для выделения нуклеиновых кислот из фекалий использовали комплекты реагентов «Рибо-сорб» и «ДНК-сорб В» производства ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», в которых используется метод аффинной сорбции нуклеиновых кислот на силикагеле. Для получения комплементарной ДНК использовали комплект реагентов

«Реверта-М». Для обнаружения бактерий и вирусов применяли следующие тест-системы АмплиСенс® (Москва): «АмплиСенс® Shigella species, EIEC» – для выявления ДНК микроорганизмов рода *Shigella* и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC) «АмплиСенс® Salmonella species», «АмплиСенс® Campylobacter species» «АмплиСенс® Rotavirus-290», «АмплиСенс® Norovirus 1, 2 genotypes» (раздельная детекция), «АмплиСенс® Astrovirus-165», «АмплиСенс® Adenovirus-462». После проведения скрининга образцы фекалий, в которых не было выявлено ни одного возбудителя, дополнительно тестировали на наличие СВ и ротавирусов гр. С с применением комплектов реагентов производства ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора [2]. В дальнейшем в 2006 году методом прямого секвенирования была исследована часть изолированных штаммов СВ (по 481 базовой паре оснований (п.о.), 5137-5611 (X86560), УРОМА).

Из исследования были исключены 133 пациента, у которых в течение 48 часов от момента госпитализации не удалось собрать образцы фекалий для проведения исследований методом ПЦР из-за отсутствия стула. В дальнейшем сбор материала у данных больных не проводили, чтобы исключить возможность внутрибольничного инфицирования.

### Результаты

В результате исследования, продолжавшегося 12 месяцев, возбудители кишечных инфекций были обнаружены методом ПЦР у 422 больных (56,0%). Вирусы были выделены из 183 образцов фекалий (24,3%), в том числе: ротавирусы группы А – 51 образец (5,8%); ротавирусы группы С – 6 (0,8%); норовирусы – 01-15 (2,0%); норовирусы – 02-66 (8,8%), саповирусы – 7 (0,9%), астровирусы – 27 (3,6%), аденовирусы – 11 (1,5%).

Возраст пациентов, из испражнений которых были выделены СВ, составил от 15 до 56 лет. СВ выделены от больных в январе, феврале, мае (по одному случаю), июле и октябре (по два случая). Практически все больные были госпитализированы в инфекционное отделение с диагнозом пищевой токсикоинфекции (6 из 8) и выписаны с этим же диагнозом в связи с отсутствием лабораторной верификации данных случаев ОКИ на момент выписки. В 3 случаях установлена средняя степень тяжести течения инфекционного процесса, в трех случаях – легкая, в одном – тяжелое течение. Основными проявлениями болезни были симптомы гастроэнтерита: водянистый или кашицеобразный стул и тошнота во всех случаях, рвота – у пяти больных, боли в животе – в 6 из 7 случаев. Краткость рвоты в 4 случаях не превышала 3-7 раз в сутки, частота стула в большинстве случаев составляла 3-8 раз в сутки. В то же время в случае тяжелого течения саповирусной инфекции у мужчины 34 лет кратность рвоты и стула достигала 20 раз в сутки. Урчание в животе отмечали четверо больных. Проявления синдрома интоксикации были у большинства больных незначительными (5 случаев) или умеренными (2 из 7). Основными его проявлениями были слабость (во всех случаях), головная боль (в 2 случаях), головокружение (1 случай), озноб (4 случая), повышение температуры тела (6 случаев), преимущественно до субфебрильных цифр в течение одного-двух дней. Максимальное зарегистрированное значение температуры тела составило 38°C. Синдром дегидратации регистрировали в 5 случаях: в 4 – первой и в 1 – второй степени (в соответствии с классификацией степеней обезвоживания по В.И. Покровскому, В.В. Малееву, 1978). Следует отметить, что средняя длительность диарейного синдрома составила 4 дня, максимальная – 7 суток в случае тяжелого течения заболевания.

Методом прямого секвенирования исследованы 3 из 7 изолированных штаммов СВ, выделенных в июле 2005, а также январе и феврале 2006 года. Все исследованные штаммы СВ принадлежали к 1-му генотипу, подтипу 01/2 (изоляты аналогичны референтным изолятам Parkville/1994/US и Houston/1990/US).

**Обсуждение.** В данном исследовании впервые показана циркуляция СВ на Южном Урале и определен генотип части выделенных штаммов. СВ, выделенные в разное время, принадлежали к одному генотипу – 01/2. Не прослеживалась сезонность заболеваемости: СВ выделяли от больных ОГЭ круглогодично примерно с одинаковой частотой.

В сравнении с другими вирусами (в первую очередь норо- и ротавирусами), вклад СВ в этиологическую структуру ОКИ у больных обследованной группы оказался невелик (0,9%). Полученные результаты согласуются с данными зарубежных исследователей о преобладании в патологии человека именно норовирусов и меньшем значении СВ [2, 4, 5, 6]. Частота выделения саповирусов в этих работах составила от 0,2 до 9,3% [2, 8-11].

Возможной причиной низкой частоты обнаружения СВ в данном исследовании может быть истинный невысокий уровень заболеваемости саповирусной инфекцией в данном регионе. В то же время следует иметь в виду, что тестирование проводили только у госпитализированных по поводу ОКИ больных. Следовательно, полученные данные нельзя экстраполировать на уровень заболеваемости населения саповирусной инфекцией в целом, поскольку в стационар попадают больные преимущественно со среднетяжелыми и тяжелыми формами заболевания. Больные с легкими формами ОКИ находятся на амбулаторном лечении или вовсе не обращаются за медицинской помощью. Причем взрослые больные, как правило, обращаются за медицинской помощью по поводу диарейных заболеваний гораздо реже, чем дети. Следовательно, большая часть легких форм саповирусной инфекции у детей и особенно у

взрослых не попадает в поле зрения врачей. Имеются сведения, что саповирусная инфекция у детей протекает легче, нежели рота- и норовирусная инфекции [6, 8].

Дизайн данного исследования не позволил судить также о частоте одновременного присутствия в фекалиях СВ и других возбудителей ОКИ, поскольку на СВ тестировали только те образцы, которые не содержали патогенных бактерий и других вирусов.

Клиническая картина саповирусной инфекции не отличалась от таковой при других вирусных диарейных заболеваниях [8, 12, 13]. Небольшое число наблюдений не позволило судить об особенностях течения данного заболевания у взрослых. В то же время результаты сравнительного изучения клинической картины других вирусных инфекций (рота-, норо- и астровирусной) у взрослых, опубликованные ранее, продемонстрировали их схожесть и отсутствие каких-либо опорных признаков для постановки диагноза только по клиническим данным [13]. Тем не менее при анализе течения саповирусной инфекции обращает на себя внимание несколько большая длительность диарейного синдрома в сравнении с норовирусной и ротавирусной инфекцией (2,5 и 3,1 дня соответственно) [13]. Продолжительность диареи в сравнении с другими ВГЭ может достигать при саповирусной инфекции 2 недель [14].

**Заключение.** Таким образом, впервые установлен факт циркуляции саповирусов на Южном Урале. Вклад данных возбудителей в этиологическую структуру ОКИ у взрослых больных в инфекционном стационаре не является значительным (0,9%). В то же время истинная распространенность саповирусов в популяции и связанных с ними заболеваний требуют дальнейшего изучения.

## СЕПСИС. РАЦИОНАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

Белобородов В.Б. (Москва)

Актуальность сепсиса определяется ростом заболеваемости, высокой летальностью и увеличением затрат, связанных с лечением больных. По современным взглядам, сепсис представляет собой реакцию на инфекцию в виде генерализованного воспаления, которая может протекать без развития органной дисфункции (сепсис), с развитием органной дисфункции (тяжелый сепсис) и артериальной гипотензии (септический шок).

Диагностика сепсиса основана на клинических данных, однако применение современных методик лабораторного обследования (лейкоцитоз, палочкоядерный сдвиг, белки острой фазы, прокальцитонин) и визуализации (ультразвуковое исследование, компьютерная томография) позволяет резко повысить быстроту и эффективность выявления очага инфекции. Микробиологическое исследование крови и тканей, содержимого нормально стерильных полостей направлено на выявление возбудителя и определение его чувствительности к антибиотикам. Это исследование имеет принципиальное значение для конкретного пациента (адекватность стартовой антибактериальной терапии) и для общества в целом (эпидемиологические данные, динамика антибиотикорезистентности, политика применения антибиотиков). Биохимические исследования и оценка функциональных тестов позволяют в полной мере оценить наличие, степень выраженности и динамику органной дисфункции – основной причины летальных исходов больных сепсисом. Методы прикроватного мониторинга являются актуальными для больных тяжелым сепсисом и септическим шоком, так как в реальном времени позволяют отслеживать динамику жизненно важных функций организма и оценивать эффективность мероприятий, направленных на их коррекцию.

Лечение больных сепсисом включает два основных направления: санацию очага инфекции и коррекцию нарушений жизненно важных функций организма. Санация очага инфекции, как правило, включает применение антибактериальной терапии и различных хирургических методов лечения (вскрытие, дренирование, иссечение и др.). Выбор антибактериальной терапии основан на данных о локализации очага (наиболее вероятный возбудитель), внебольничном или нозокомиальном характере (резистентность) флоры и тяжести инфекции. Доказано, что стартовая терапия подходящим антибиотиком достоверно снижает летальность больных ангиогенным и пневмогенным сепсисом. В условиях оптимального контроля очага инфекции (адекватная антибактериальная терапия + адекватная хирургическая санация) важную роль в профилактике развития полиорганной недостаточности может играть применение поликлональных иммуноглобулинов для внутривенного введения (доказано снижение летальности в 1,5-2,5 раза). Необходимость временного замещения органной дисфункции доказана в большом количестве клинических исследований. В настоящее время считается обязательным включение в протокол лечения следующих мето-