

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ДЕТСКОМ ИНФЕКЦИОННОМ СТАЦИОНАРЕ: ВОЗМОЖНОСТИ И ПРОБЛЕМЫ

Е.Д. Соколова¹, А.М. Галтаева¹, О.Ю. Замурий¹, О.В. Дидиченко¹,
Ю.В. Соколова¹, В.А. Муратова¹, О.Ю. Лигорова¹, И.Н. Журавлева¹,
М.А. Макарова², Л.А. Кафтырева²

¹ Детская городская клиническая больница № 5 им. Н.Ф. Филатова, Санкт-Петербург, Россия

² ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Изучена этиологическая структура острых кишечных инфекций у детей, госпитализированных с диареей в детский инфекционный стационар, с целью оценки возможностей совершенствования этиологической расшифровки заболеваний при дополнении традиционных бактериологических методов ПЦР-диагностикой с применением отечественных мульти-прайм ПЦР-реагентов. Использовали 4 набора реагентов, обеспечивающих одновременную индикацию нескольких патогенов в одной пробе: 1) *Rotavirus*, *Norovirus*, *Astrovirus*; 2) *Shigella* spp./EIEC, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.; 3) *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis*; 4) *Escherichia coli*: EIEC (энтероинвазивные), EPEC (энтеропатогенные), ETEC (энтеротоксигенные), EHEC (энтерогеморрагические), EAgEC (энтероагрегативные). Показано, что этиологическая диагностика вирусных диарей увеличивается на 14%, бактериальных – в 2,5 раза. ПЦР-диагностика выявила у 62% пациентов вирусную природу гастроэнтеритов: *Rotavirus* (52%), *Norovirus* (9%), *Astrovirus* (1%). Количество выявленных ПЦР-маркеров бактериальных возбудителей ОКИ оказалось в 2,5 раза больше, чем по данным бактериологического исследования. Спектр выявляемых бактериальных агентов увеличился за счет *E. coli* и *Y. enterocolitica*. ПЦР-диагностика в 2 раза повысила выявляемость *Campylobacter* spp. и оказалась единственным эффективным методом детекции ДНК *E. coli* в пробах испражнений: доминировали EPEC – 66%, EAgEC, ETEC и EHEC составили 31, 9 и 4% соответственно, которые не могли быть идентифицированы при бактериологическом исследовании. ДНК *Campylobacter* spp. и *E. coli* в сумме составляли 2/3 находок среди бактериальных возбудителей: *Campylobacter* spp. (41%), *E. coli* (24%), *Salmonella* spp. (19%), *Yersinia* spp. (11%), *Shigella* spp./EIEC (5%). Положительные результаты бактериологического посева проб испражнений и серологического исследования крови в РНГА дублировали положительные результаты ПЦР-диагностики. В целом, положительные результаты ПЦР-диагностики бактериальных патогенов установлены у 46,35% обследованных пациентов. У 53,65% пациентов выявлены ПЦР-маркеры ОКИ смешанной этиологии, в основном вирусно-бактериальной, из них в 48,4% случаях выявлены 19 различных вариантов ассоциаций. 12 вариантов бактериальных ассоциаций обнаружены в 5,25%, из них у 11% обнаружены ДНК 2–3 возбудителей бактериальных ОКИ. Проведенное исследование расширило наши

Адрес для переписки:

Соколова Екатерина Дмитриевна
192289, Санкт-Петербург, ул. Бухарестская, 134,
Детская городская клиническая больница № 5
им. Н.Ф. Филатова.
Тел.: (812) 400-04-18 (служебн.); 8 (921) 774-73-71 (моб.).
E-mail: ed_sokolova@mail.ru

Contacts:

Ekaterina D. Sokolova
197101, Russian Federation, St. Petersburg,
Bukharetskaya str., 134, Children's Municipal
Clinical Hospital n. a. N.F. Filatov.
Phone: +7 (812) 400-04-18 (office); +7 (921) 774-73-71 (mobile).
E-mail: ed_sokolova@mail.ru

Библиографическое описание:

Соколова Е.Д., Галтаева А.М., Замурий О.Ю., Дидиченко О.В.,
Соколова Ю.В., Муратова В.А., Лигорова О.Ю., Журавлева И.Н.,
Макарова М.А., Кафтырева Л.А. Полимеразная цепная реакция
в диагностике острых кишечных инфекций в детском инфекционном
стационаре: возможности и проблемы // Инфекция и иммунитет. 2016.
Т. 6, № 3. С. 225–231. doi: 10.15789/2220-7619-2016-3-225-231

Citation:

Sokolova E.D., Galtaeva A.M., Zamurei O.U., Didichenko O.V., Sokolova U.V.,
Muratova V.A., Ligorova O.U., Zhuravleva I.N., Makarova M.A., Kaftyreva L.A.
Acute enteric infections polymerase chain reaction assay in pediatric
practice: opportunities and challenges // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 3, pp. 225–231.
doi: 10.15789/2220-7619-2016-3-225-231

представления об этиологии ОКИ у детей в Санкт-Петербурге в 2012–2014 гг.: доминировала ротавирусная инфекция, кампилобактериоз и эшерихиозы. Детекция ПЦР-маркеров нескольких возбудителей, особенно вирусно-бактериальных, превышала 50% всех диагностированных случаев ОКИ.

Ключевые слова: острые кишечные инфекции, ПЦР-диагностика, энтеропатогены, *Rotavirus*, *Norovirus*, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia*.

ACUTE ENTERIC INFECTIONS POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY IN PEDIATRIC PRACTICE: OPPORTUNITIES AND CHALLENGES

Sokolova E.D.^a, Galtaeva A.M.^a, Zamurei O.U.^a, Didichenko O.V.^a, Sokolova U.V.^a, Muratova V.A.^a, Ligorova O.U.^a, Zhuravleva I.N.^a, Makarova M.A.^b, Kaftyreva L.A.^b

^a St. Petersburg Children's Municipal Clinical Hospital named after N.F. Filatov, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the study is estimate the opportunities of local multi-prime PCR reagents kits in children enteric infections etiological diagnostics amongst the patients with diarrhoea vs traditional bacteriological methods. We used 4 kits of reagents that provide multiple pathogens simultaneous indication in one sample: 1) *Rotavirus*, *Norovirus*, *Astrovirus*; 2) *Shigella spp./EIEC*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*; 3) *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*; 4) *E. coli*: EIEC (enteroinvasive), EPEC (enteropathogenic), ETEC (enterotoxigenic), EHEC (enterohaemorrhagic), EA_gEC (enteroaggregative). It has been shown that the viral intestinal infections is increased by 14%, bacterial — in 2,5 times. PCR diagnostics identified in 62% of patients the viral gastroenteritis: *Rotavirus* (52%), *Norovirus* (9%), *Astrovirus* (1%). Detected bacterial pathogens PCR markers number proved up to 2.5 times high than according to bacteriological examination. The spectrum of bacterial agents increased due to *E. coli* and *Y. enterocolitica*. PCR diagnostics increased detection of *Campylobacter* up to 2 times. Detected *E. coli* DNA prevalence: EPEC — 66%, EA_gEC, ETEC and EHEC were 31%, 9% and 4%, respectively. DNA *Campylobacter spp.* and *E. coli* constituted $\frac{2}{3}$ of all findings: *Campylobacter spp.* (41%), *E. coli* (24%), *Salmonella spp.* (19%), *Yersinia spp.* (11%), *Shigella spp./EIEC* (5%). The positive results of bacteriological and serological methods duplicate the positive results of PCR diagnostics. In general, the positive results of PCR diagnosis of bacterial pathogens were detected in 46.35% of the examined patients. In 48.4% of patients identified PCR markers viral — bacterial infection, in 5.25% — of bacterial associations, in 11% of them were found the DNA 2–3 bacterial pathogens. The study was shown in children in St. Petersburg in 2012–2014 dominated rotavirus infection, campylobacteriosis and escherichiosis. The prevalence of viral-bacterial infections is more than 50% of all diagnosed cases.

Key words: enteric infections, PCR diagnostics, enteropathogens, *Rotavirus*, *Norovirus*, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia*.

Введение

Острые кишечные инфекции (ОКИ) занимают одно из ведущих мест в структуре инфекционной патологии детей и остаются актуальной проблемой для здравоохранения в России и в настоящее время. По данным официальной статистики Роспотребнадзора заболеваемость детей ОКИ превышает заболеваемость взрослого населения в 1,5 раза. Ежегодно у детей регистрируют более полумиллиона случаев ОКИ, из которых около 60% остаются этиологически неустановленными, что создает определенные сложности в назначении препаратов выбора для терапии данных заболеваний у детей и проведении целенаправленных профилактических и противоэпидемических мероприятий [3, 4]. В санитарных правилах «Профилактика острых кишечных инфекций» (СП 3.1.1.3108-13) регламентировано подтверждение этиологии ОКИ любыми методами, доступными для лаборатории. Методами для подтверждения этиологии ОКИ являются выделение и идентифика-

ция возбудителя с помощью питательных сред и биохимических тестов (традиционный бактериологический анализ проб испражнений с выделением живой культуры энтеропатогена бактериальной природы), полимеразная цепная реакция (ПЦР), серологические методы исследования (РПГА, ИФА), а также другие методы, позволяющие проводить индикацию и идентификацию возбудителей и токсинов.

Цель данного исследования состояла в оценке результативности дополнения традиционной этиологической диагностики ОКИ в детском инфекционном стационаре ПЦР-исследованиями фекалий с использованием отечественных реагентов. Задачи исследования включали: 1) оценку возможностей ПЦР-диагностики вирусных гастроэнтеритов; 2) сравнение результатов ПЦР и бактериологического метода в выявлении бактериальных энтеропатогенов (ДНК или живая культура): *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia spp.* и *E. coli*; 3) сравнение результатов ПЦР и РПГА в диагностике шигеллез, сальмонеллез и иерсиниоз;

4) оценка новизны и значимости результатов ПЦР-диагностики ОКИ для лечебной практики в детском инфекционном стационаре.

Материалы и методы

Контингент обследуемых — пациенты в возрасте от 1 месяца до 18 лет, поступившие в больницу с симптомами ОКИ в 2012–2014 гг. Для исследования фекалий на ДНК/РНК возбудителей ОКИ использовали 4 набора реагентов производства ЦНИИЭ серии «МультиПрайм», обеспечивающие одновременную индикацию в одной пробе нескольких патогенов: 1) *Rotavirus*, *Norovirus*, *Astrovirus*; 2) *Shigella* spp./EIEC, *Salmonella* spp. и *Campylobacter* spp.; 3) *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis*. Этот набор реагентов обеспечивает также определение генетических маркеров патогенности *Yersinia enterocolitica*: энтеротоксина (*Yst*), инвазина (*ail*) и адгезина (*yadA*); 4) *Escherichia coli*: EIEC/*Shigella* spp. (EIEC — энтероинвазивные *E. coli*), энтеропатогенные (EPEC), энтеротоксигенные (ETEC), энтерогеморрагические (EHEC), энтероаггративные (EAgEC);

Метод иммуноферментного анализа (ИФА) применяли для выявления в фекалиях антигена ротавируса. Использовали ИФА-диагностикум «Аквапаст».

Для выделения и идентификации бактериальных возбудителей ОКИ использовали селективные и дифференциально-диагностические питательные среды отечественного производства, согласно действующим нормативным документам. Антигенную характеристику энтеробактерий определяли в реакции агглютинации с диагностическими сыворотками к *E. coli* (ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, Московская область), *Shigella* spp., *Salmonella* spp., и *Yersinia* spp. (НИИВиС, Санкт-Петербург). Методом РНГА в сыворотках крови больных определяли антитела к возбудителям шигеллез (*S. flexneri* и *S. sonnei*), иерсиниозов (*Y. enterocolitica* — O:3 и O:9 и к *Y. pseudotuberculosis*), используя диагностикумы (НИИВиС, Санкт-Петербург), и к O-антигенам *Salmonella* spp. серогрупп А, В, С1, С2, Д, Е (диагностикум ООО «Био-Диагностика», Москва).

Все исследования поступивших в лабораторию образцов фекалий пациентов проводились в соответствии с назначениями лечащих врачей. Исследования проводились 3 разными группами врачей КДЛ. Сбор и анализ всех данных был проведен ретроспективно.

Результаты

Вирусные гастроэнтериты. В сравнительных исследованиях обнаружения ротавируса в фекалиях пациентов с гастроэнтеритом, ПЦР- и ИФА-анализы дали близкие результа-

ТАБЛИЦА 1. ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОКИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ В ПРОБАХ ФЕКАЛИЙ 3719 ПАЦИЕНТОВ ОТЕЧЕСТВЕННЫМИ ПЦР-НАБОРАМИ СЕРИИ «МУЛЬТИПРАЙМ»

Возбудитель ОКИ	Количество	%
<i>Campylobacter</i> spp.	398	41
<i>Escherichia coli</i> (EPEC, ETEC, EHEC, EAgEC)	232	24
<i>Salmonella</i> spp.	182	19
<i>Yersinia enterocolitica</i>	102	10
<i>Shigella</i> spp./EIEC	50	5
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	8	1
Всего	972	100

ты. Различия составляли менее 5% и не были однонаправленными, то есть не указывали на преимущество в чувствительности одного из этих методов индикации ротавируса. Поэтому представлялось целесообразным использовать мультиплексную ПЦР лишь для дополнительного исследования проб фекалий, в которых методом ИФА ротавирус не был обнаружен. В целом по указанному алгоритму маркеры вирусов — возбудителей гастроэнтерита выявили в фекалиях 678 (62%) из 1101 пациента. Большую часть положительных результатов дал первый этап исследования: ИФА-анализ выявил 528 (48%) пациентов с ротавирусным гастроэнтеритом. Второй этап анализа — мультиплексная ПЦР — выявил еще 43 (4%) пациента с ротавирусной инфекцией, 97 (9%) — с норовирусной и 10 (1%) с астровирусной. В целом, дополнительное к ИФА использование отечественной мультиплексной ПЦР-тест системы для выявления рота-, норо- и астровирусной инфекций увеличило количество пациентов с установленной этиологией вирусного гастроэнтерита на 14% (с 48 до 62%), спектр выявленных возбудителей увеличился с одного до трех.

Диагностика бактериальных ОКИ. Три вышеупомянутых ПЦР-набора для диагностики бактериальных ОКИ использовали при обследовании пациентов с различной интенсивностью. Наибольшей популярностью у лечащих врачей пользовался набор для выявления *Shigella* spp./EIEC, *Salmonella* spp. и *Campylobacter* spp. (3136 из 3719 пациентов). ПЦР-наборы для диагностики иерсиниозов и эшерихиозов использовались при обследовании 1954 и 1784 пациентов соответственно. В среднем на одного пациента пришлось по четыре нозологических ПЦР-исследования. Положительные результаты ПЦР-диагностики были получены у 861 (23%) из обследованных пациентов, при этом у части из них (11%) выявлены ДНК 2–3 возбудителей бактериальных ОКИ, всего — 972. Абсолютные и относительные количества каждого из детектируемых по ДНК-маркерам воз-

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ПАРАЛЛЕЛЬНОГО БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ РЕЗУЛЬТАТОМ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОКИ

Возбудитель ОКИ	Пациенты с положительным результатом выявления возбудителя в стуле (количество)		
	методом ПЦР	бактериологическим посевом	
		всего	%
<i>Salmonella</i> spp.	142	90*	63
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Yst+/ail+/yadA+)	35	22**	63
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	8	4***	50
<i>Campylobacter</i> spp.	258	121****	47
<i>Shigella</i> spp./EIEC	39	17*****	44
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Yst-/ail-/yadA-)	32	0	0
<i>E. coli</i> (EPEC, ETEC, EHEC, EAgrEC)	169	0	0
Всего	683	254	37

Примечание: бактериологическим методом в фекалиях пациентов были выявлены и идентифицированы следующие возбудители ОКИ: * 90 пациентов: *S. Enteritidis* — 66, *S. Montevideo* — 1, *S. Typhimurium* — 17, *S. Agona* — 1, *S. Infantis* — 1, *S. Risen* — 1, *S. Typhi* — 1, *Salmonella* группы «C1» — 1, «C2» — 1; ** 22 пациента — *Y. enterocolitica* IV 6/в O3 с-гр; *** 4 пациента — *Y. pseudotuberculosis*; **** 121 пациент — *C. jejuni* ***** 17 пациентов: *S. flexneri* — 11, *S. sonnei* — 4, *E. coli* O124 — 1, O144 — 1.

будителей бактериальной диареи существенно различались (табл. 1). *Campylobacter* spp. и *E. coli* в сумме составляли 2/3 всех находок.

Положительные результаты ПЦР-диагностики бактериальных ОКИ 683 пациентов 2012–2013 гг. были сопоставлены с результатами параллельного бактериологического исследования фекалий (табл. 2). Результаты ПЦР- и бактериологической индикации *Salmonella* spp. и *Y. enterocolitica* (Yst+/ail+/yadA+) оказались наиболее близкими. Однако и в этих случаях положительные результаты бактериологического посева составляли 63% результативности ПЦР-диагностики. Ни в одном случае обнаружения в фекалиях ДНК-маркеров *Y. enterocolitica* (Yst-/ail-/yadA-) и *E. coli* (EPEC, ETEC, EHEC, EAgrEC) бактериологический посев не дал положительного результата. Совпадение отрицательных результатов бактериологического посева с отрицательными результатами ПЦР-исследования фекалий напротив было

полным: 100% для *Shigella* spp./EIEC (578/578), *Y. enterocolitica* (119/119) и *Y. pseudotuberculosis* (178/178) и 99% для *Campylobacter* spp. (293/294), *Salmonella* spp. (480/482) и диарогенных *E. coli* (203/206).

Данных для сопоставления положительных результатов ПЦР- и РНГА-диагностики ОКИ оказалось значительно меньше: только для 141 пациента. Близкие ПЦР-диагностике результаты получились только в отношении инфекции, вызванной «вирулентной» *Y. enterocolitica*: диагностический уровень антител выявили у 75% пациентов (табл. 3). Пациенты, у которых методом ПЦР обнаружены ДНК *Salmonella* spp. или *Y. pseudotuberculosis*, диагностические уровни соответствующих антител находили только в 25% случаев. Для выявления инфекций, вызванных *Campylobacter* spp., *Y. enterocolitica* (Yst-/ail-/yadA-) и диарогенными *E. coli*, отечественные РНГА-диагностикумы не разработаны. Совпадение отрицательных результа-

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ РЕЗУЛЬТАТОМ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОКИ

Возбудитель ОКИ	Пациенты с положительным результатом этиологической диагностики ОКИ		
	методом ПЦР	РНГА	
		всего	%
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Yst+/ail+/yadA+)	28	21*	75
<i>Salmonella</i> spp.	47	13**	28
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	8	2***	25
<i>Shigella</i> spp./EIEC	32	2****	6
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Yst-/ail-/yadA-)	26	0	0
Всего	141	38	27

Примечание: *В 13 из 21 случая результат подтверждался бактериологическим исследованием — *Y. enterocolitica* O:3; ** в 10 из 13 случаев результат подтверждался бактериологическим исследованием: *S. Enteritidis* — 9, *S. Typhimurium* — 1; *** в обоих случаях результат совпал с данными бактериологического исследования — *Y. pseudotuberculosis*; **** в обоих случаях результат совпал с данными бактериологического исследования — *S. sonnei*.

тов РНГА-диагностики с отрицательными результатами ПЦР-диагностики составило 100% для *Y. enterocolitica* (74/74) и *Y. pseudotuberculosis* (117/117), 99% — для *Shigella* spp./EIEC (198/200) и *Salmonella* spp. (172/174).

Микст-ОКИ. У 323 из 668 пациентов в фекалиях был выявлен 751 ПЦР-маркер возбудителей бактериальных ОКИ и вирусных гастроэнтеритов, в основном РНК ротавируса. Таким образом, моно-ОКИ наблюдались менее чем у половины госпитализированных пациентов (табл. 4). Доминировали вирусно-бактериальные ОКИ. У 38 пациентов обнаружилось ПЦР-маркеры трех или четырех возбудителей ОКИ.

Иерсиниозы. При обследовании 1067 пациентов «вирулентная» и «авирулентная» *Y. enterocolitica* были обнаружены в фекалиях практически одинакового количества пациентов: 39 (3,6%) и 40 (3,7%) соответственно. Диагноз для основного или сопутствующего заболевания «энтерит, вызванный *Y. enterocolitica*» (А.04.6 в соответствии МКБ-10), был поставлен 34 пациентам каждой группы (то есть 87 и 85% соответственно). Анализ историй болезни выявил, что по средним показателям пациенты, у которых была обнаружена «авирулентная» *Y. enterocolitica*, были младше ($M_e = 5$ и 7 лет, соответственно) и у них чаще выявлялось несколько возбудителей ОКИ (38 и 28% соответственно), чем пациенты с инфекцией, вызванной «вирулентным» вариантом этого микроорганизма.

Эшерихиозы. ПЦР-диагностика выявила широкую распространенность у госпитализированных пациентов ОКИ, обусловленных *E. coli*. По частоте выявления доминировали ЕРЕС — 66%. Доли ЕАгЕС, ЕТЕС и ЕНЕС составили 31, 9 и 4% соответственно. Средний возраст пациентов с эшерихиозом был 4 года, при диапазоне от 1 месяца до 16 лет.

Обсуждение

Сравнительные исследования, проведенные разными авторами, так же как и наши данные, доказывают, что ПЦР значительно эффективнее для выявления любого возбудителя диареи, чем традиционные бактериологические методы [2, 5, 9, 12, 14]. Особенно диагностическое превосходство ПЦР значимо в выявлении таких возбудителей ОКИ, как *Campylobacter* spp., *E. coli* и *Clostridium difficile*. По мнению исследователей, занимавшихся подобными сравнениями, титул «золотого стандарта» прямой этиологической диагностики ОКИ переходит от биологических методов к ПЦР. Методом ПЦР в настоящее время проводят исследования по эпидемиологии ОКИ в разных регионах мира [1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11], изучают распространенность бессимптомного носительства возбудителей ОКИ

ТАБЛИЦА 4. ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ОКИ 668 ПАЦИЕНТОВ, ВЫЯВЛЕННЫЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ПЦР- И ИФА-ИССЛЕДОВАНИЙ ФЕКАЛИЙ

Этиологический вариант инфекции кишечника	Пациенты	
	Количество	%
Бактериальные моноинфекции		
<i>Campylobacter</i> spp.	117	17,50
<i>Escherichia coli</i> *	72	10,80
<i>Salmonella</i> spp.	51	7,60
<i>Yersinia enterocolitica</i>	47	7,00
<i>Shigella</i> spp./EIEC	20	3,00
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	3	0,45
Всего	310	46,35
Бактериально-вирусные инфекции		
Всего (19 вариантов)	323	48,40
Смешанные бактериальные инфекции		
Всего (12 вариантов)	35	5,25
Всего	668	100

Примечание: * *Escherichia coli*, кроме EIEC: EPEC, ETEC, EHEC, EAgEC.

и закономерности его перехода в острое заболевание [6, 7]. Сходство симптомов ОКИ, вызванных различными возбудителями, определяет целесообразность использования ПЦР именно в мультиплексной форме, то есть с набором праймеров различной специфичности. Панель определяемых возбудителей может варьировать с учетом особенностей обследуемого контингента и решаемой задачи.

Что же дало нам дополнение ПЦР-исследований фекалий с использованием отечественных реагентов к традиционной этиологической диагностике ОКИ в детском инфекционном стационаре? Количество выявленных ПЦР-маркеров бактериальных возбудителей ОКИ в пределах заложенного спектра оказалось в 2,5 раза больше, чем по данным бактериологического исследования. Спектр выявляемых бактериальных агентов увеличился за счет диарогенных *E. coli* и *Y. enterocolitica* (*Yst*–/*ail*–/*yadA*–). Положительные результаты бактериологического посева и РНГА только дублировали положительные результаты ПЦР-диагностики. ПЦР-реагенты для диагностики вирусных гастроэнтеритов обеспечили возможность выявления трех возбудителей вместо одного, доступного для отечественных ИФА-диагностикомов. Результаты ПЦР-диагностики и бактериальных, и вирусных ОКИ воспринимались клиницистами как адекватные и являлись основанием для постановки этиологического диагноза.

Проведенное исследование углубило наши представления по этиологии ОКИ детей в Санкт-Петербурге в 2012–2014 гг.: доминировала ротавирусная инфекция, кампилобактериоз и эшерихиозы. Распространенность ин-

фекций смешанной этиологии, особенно вирусно-бактериальных, оказалась значительно выше, чем предполагалось, и превышала 50% всех диагностированных случаев ОКИ. Другими исследователями, использовавшими мультипрайм-ПЦР в сочетании с классическими методами диагностики ОКИ, получены сходные данные по распространенности ОКИ смешанной этиологии [1, 2, 7, 8, 10, 11]. В сущности, применение ПЦР-диагностики привело к появлению и осознанию новой проблемы — необходимости изучения роли отдельных возбудителей и их сообщества в патогенезе и клинике ОКИ. Вероятно, факт микст-ОКИ должен учитываться и в лечебных мероприятиях.

В фекалиях детей с диареей мы с равной частотой выявляли оба варианта *Y. enterocolitica*: положительные и отрицательные по факторам вирулентности (*Yst*, *ail* и *yadA*). Диагноз «энтерит, вызванный *Y. enterocolitica*» был поставлен более чем 80% детей независимо от наличия или отсутствия у выявленного возбудителя этих маркеров вирулентности. Не имеющие генов *Yst*, *ail* и *yadA* варианты *Y. enterocolitica*, выделенные от пациентов с диареей, описаны и другими исследователями. В основном такие изоляты относились к биотипу 1А [15]. Относились ли выявленные нами варианты *Y. enterocolitica* без указанных факторов вирулентности к этому или иному биотипу осталось неизвестным, поскольку выделить и идентифицировать их бактериологическим методом не удалось.

Применение ПЦР-диагностики показало, что распространенность эшерихиозов у пациентов детского инфекционного стационара уступает только распространенности кампилобактериоза. Среди наших пациентов было 55, у которых при обследовании нашли только эшерихии. Средний их возраст (Ме) оказался 4 года (диапазон 1 мес.—16 лет).

Итак, дополнение традиционных бактериологических методов диагностики ОКИ применением мультипрайм ПЦР-реагентов отечественного производства оказалось весьма продуктивным и в теоретическом, и в практическом аспектах. Проблема применения ПЦР для диагностики распространенных ОКИ в ее дороговизне. Вопрос этот волнует не только нас. Оксфордские ученые [13], например, считают, что применение мультиплексной ПЦР для обследования всех пациентов с диареей может быть экономически оправданным. Если в день их обращения в ЛПУ провести ПЦР-анализ на 24 возбудителя кишечных инфекций (вирусы, бактерии, простейшие и гельминты), то большая часть пациентов будет исключена из дальнейшего длительного бактериологического обследования. Инфекционная этиология этих заболеваний будет подтверждена в течение 24 ч. Но пока, видимо, можно рассчитывать только на ограниченное использование ПЦР для решения сложных и срочных задач. Целесообразно при этом обследовать пациента сразу на весь доступный спектр соответствующих инфекций. Это диктуется и трудностью дифференциации назначений по клиническим данным, и широким распространением микст-инфекций. Целесообразно использовать ПЦР для обследования поступающих в стационар пациентов на «сложно и длительно» культивируемые возбудители кампилобактериозов и иерсиниозов. В этой связи представляется желательным иметь набор мультипрайм-ПЦР, включающий тесты на *E. coli* и *Campylobacter* spp. Продуктивной могла бы быть совместная работа инфекционных стационаров и научно-исследовательских учреждений по использованию ПЦР-диагностики ОКИ для изучения особенностей этиологии, эпидемиологии и клиники микст-ОКИ.

Список литературы/References

1. Бабик Р.Л., Сагалова О.И. Оптимизация диагностики вирусных и бактериальных кишечных инфекций у детей и взрослых // Инфекционные болезни. 2015. Т. 13, № 2. С. 46–54. [Babik R.K., Sagalova O.I. Optimization of diagnostics of viral and bacterial enteric infections in children and adolescents. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2015, vol. 13, no. 2, pp. 46–54 (In Russ.)]
2. Горелов А.В., Бондарева А.В., Подколзин А.Т. Клинико-эпидемиологическая характеристика энтероагрегативного эшерихиоза у детей // Инфекционные болезни. 2013. Т. 11, № 3. С. 22–26. [Gorelov A.V., Bondareva A.V., Podkolzin A.T. Clinical and epidemiology features of enteroaggregative escherichia infection in children. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2013, vol. 11, no. 3, pp. 22–26 (In Russ.)]
3. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году: Государственный доклад Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2015. 206 с. [On the state sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2014: State report]. 2015. 206 p.]. URL: http://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/22c/gd_2014_seb_dlya-sayta.pdf (дата обращения: 14.06.2016).
4. Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях (форма 1) за январь-декабрь 2012, 2013, 2014 гг. [Information about infectious and parasitic diseases (Form 1) for January-December 2012, 2013, 2014.]. URL: <http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/?type=special> (дата обращения: 14.06.2016).
5. Antikainen J., Kantele A., Pakkanen S.H., Laaveri T., Riutta J., Vaara M., Kirveskari J. A quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection of 9 pathogens directly from stools of travelers with diarrhea. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2013, vol. 11, iss. 10, pp. 1300–1307. doi: 10.1016/j.cgh.2013.03.037

6. Barletta F., Ochoa T.J., Mercado E., Ruiz J., Ecker L., Lopez G., Mispireta M., Gil A.I., Lanata C.F., Cleary T.G. Quantitative real-time polymerase chain reaction for enteropathogenic *Escherichia coli*: a tool for investigation of asymptomatic versus symptomatic infections. *Clin. Infect. Dis.*, 2011, vol. 53, no. 12, pp. 1223–1229. doi: 10.1093/cid/cir730
7. Becker S.L., Chatigre J.K., Gohou J.P., Coulibaly J.T., Leuppi R., Polman K., Chappuis F., Mertens P., Herrman M., N’Goran E.K., Utzinger J., Von Muller L. Combined stool-based multiplex PCR and microscopy for enhanced pathogen detection in patients with persistent diarrhea and asymptomatic controls from Cote d’Ivoire. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2015, vol. 21, no. 6: 591. doi: 10.1016/j.cmi.2015.02.016
8. David E.B., Guimaraes S., De Oliveira A.P., Goulart de Oliveira-Sequeira T.C., Noqueira Bittencourt G., Moraes Nardi A.R., Martins Pibolla P.E., Bueno-Franco R.M., Branco N., Tosini F., Bella A., Pozio E., Caccio S.M. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of Sao Paulo, Brasil. *Parasit. Vectors*, 2015, vol. 8: 103. doi: 10.1186/s13071-015-0714-8
9. Goldfarb D.M., Dixon B., Moldovan I., Barrowman N., Mattison K., Zentner C., Baikie M., Bidowid S., Chan F., Slinger R. Nanolitre real-time PCR detection of bacterial, parasitic, and viral agents from patients with diarrhea in Nunavut, Canada. *Int. J. Circumpolar Health*, 2013, vol. 72: 19903. doi: 10.3402/ijch.v72i0.19903
10. Laaveri T., Pakkanen S.H., Antikainen J., Riutta J., Mero S., Kirveskari J., Antele A. High number of diarrhoeal co-infections in travelers to Benin, West Africa. *BMC Infect. Dis.*, 2014, vol. 14: 81. doi: 10.1186/1471-2334-14-81
11. Maas L., Dorigo-Zetsma J.W., De Groot C.J., Bouter S., Plotz F.B., Van Ewijk B.E. Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2014, vol. 20, no. 6, pp. 545–550. doi: 10.1111/1469-0691.12386
12. McAuliffe G.N., Anderson T.P., Stevens M., Adams J., Coleman R., Vahagamasera P., Young S., Henderson T., Hoffmann M., Jennings L.C., Murdoch D.R. Systematic application of multiplex PCR enhances the detection of bacteria, parasites and viruses in stool samples. *J. Infect.*, 2013, vol. 67, no. 2, pp. 122–129. doi: 10.1016/j.jinf.2013.04.009
13. Pankhurst L., Macfarlane-Smith L., Buchanan J., Anson L., Davies K., O’Connor L., Ashwin H., Pike G., Dingle K.E., Peto T.E., Wordworth S., Walker A.S., Wilcox M.H., Crook D.W. Can rapid integrated polymerase chain reaction-based diagnostics for gastrointestinal pathogens improve routine hospital infection control practice? A diagnostic study. *Health Technol. Assess*, 2014, vol. 18, no. 53, pp. 1–167. doi: 10.3310/hta18530
14. Perry M.D., Corden S.A., Howe R.A. Evaluation of the Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel and the Savyon Diagnostics Gastrointestinal Infection Panel for the detection of enteric pathogens in clinical samples. *J. Med. Microbiol.*, 2014, vol. 63, pt. 11, pp. 1419–1426. doi: 10.1099/jmm.0.074773-0
15. Tennat S.M., Grant T.H., Robins-Browne R.M. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003, vol. 38, no. 2, pp. 127–137.

Авторы:

Соколова Е.Д., д.б.н., старший научный сотрудник, врач-вирусолог Клинико-диагностической лаборатории Детской городской клинической больницы № 5 им. Н.Ф. Филатова, Санкт-Петербург, Россия;

Галтаева А.М., врач-бактериолог Клинико-диагностической лаборатории Детской городской клинической больницы № 5 им. Н.Ф. Филатова, Санкт-Петербург, Россия;

Замурий О.Ю., врач-бактериолог Клинико-диагностической лаборатории Детской городской клинической больницы № 5 им. Н.Ф. Филатова, Санкт-Петербург, Россия;

Дидиченко О.В., врач-бактериолог Клинико-диагностической лаборатории Детской городской клинической больницы № 5 им. Н.Ф. Филатова, Санкт-Петербург, Россия;

Соколова Ю.В., врач клинической лабораторной диагностики, Клинико-диагностической лаборатории Детской городской клинической больницы № 5 им. Н.Ф. Филатова, Санкт-Петербург, Россия;

Муратова В.А., врач-бактериолог Клинико-диагностической лаборатории Детской городской клинической больницы № 5 им. Н.Ф. Филатова, Санкт-Петербург, Россия;

Лигорова О.Ю., врач-бактериолог Клинико-диагностической лаборатории Детской городской клинической больницы № 5 им. Н.Ф. Филатова, Санкт-Петербург, Россия;

Журавлева И.Н., врач-бактериолог Клинико-диагностической лаборатории Детской городской клинической больницы № 5 им. Н.Ф. Филатова, Санкт-Петербург, Россия;

Макарова М.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Кафтырева Л.А., д.м.н., профессор, зав. лабораторией кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Sokolova E.D., PhD, MD (Biology), Senior Researcher, Virologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Children’s Municipal Clinical Hospital named after N.F. Filatov, St. Petersburg, Russian Federation;

Galtaeva A.M., Bacteriologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Children’s Municipal Clinical Hospital named after N.F. Filatov, St. Petersburg, Russian Federation;

Zamurei O.Yu., Bacteriologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Children’s Municipal Clinical Hospital named after N.F. Filatov, St. Petersburg, Russian Federation;

Didichenko O.V., Bacteriologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Children’s Municipal Clinical Hospital named after N.F. Filatov, St. Petersburg, Russian Federation;

Sokolova Yu.V., Laboratory Diagnostics Specialist, Clinical Diagnostic Laboratory, Children’s Municipal Clinical Hospital named after N.F. Filatov, St. Petersburg, Russian Federation;

Muratova V.A., Bacteriologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Children’s Municipal Clinical Hospital named after N.F. Filatov, St. Petersburg, Russian Federation;

Ligorova O.Yu., Bacteriologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Children’s Municipal Clinical Hospital named after N.F. Filatov, St. Petersburg, Russian Federation;

Zhuravleva I.N., Bacteriologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Children’s Municipal Clinical Hospital named after N.F. Filatov, St. Petersburg, Russian Federation;

Makarova M.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Kaftyreva L.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.