

© Коллектив авторов, 2006

*О.В. Москалец, А.Е. Машков, Е.З. Друзюк, Ю.А. Бургакова,
В.И. Щербина, О.Ю. Манзенюк*

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Московский областной научно-исследовательский институт им. М.Ф. Владимирского, Москва

В статье дан сравнительный анализ диагностики «оппортунистических» инфекций методом ПЦР, РИФ и ИФА, подробно приведены их преимущества и недостатки. Проведено скрининговое обследование 105 детей, находившихся на стационарном лечении с различной хирургической и соматической патологией, на частоту выявления атипичных микроорганизмов методом ПЦР. Полученные данные свидетельствуют о достаточно высокой частоте встречаемости патогенных возбудителей у детей с врожденными пороками развития, заболеваниями бронхолегочной системы, пиелонефритом.

Article presents comparative analysis of different methods for «opportunistic» infections diagnosis by methods of PCR, RIF and ELIZA and discusses their advantages and lacks. Screening examination for detection of atypical microorganisms by PCR method was performed in 105 children hospitalized because of different surgical and somatic diseases. Data of examination shows high rate of pathogens detection in children with congenital malformations, with bronchopulmonary diseases and with pyelonephritis.

В настоящее время в состоянии здоровья населения нашей планеты наметилась тревожная тенденция: постоянно увеличивается количество лиц с иммунной недостаточностью, что в первую очередь проявляется снижением противoinфекционной защиты. Структура инфекционной патологии претерпела существенные изменения и сейчас в ней преобладают микст-инфекции и инфекции, вызванные условно-патогенной микрофлорой [1—4]. Кроме того, у детей наблюдается так называемый феномен «медленного иммунологического старта», т. е. созревание иммунной системы, которое в норме завершается к 5-летнему возрасту, задерживается. Такие дети длительно и часто болеют ОРВИ, склонны к часто рецидивирующей герпетической инфекции, фурункулезу. В перспективе это кандидаты на так называемый синдром вторичной иммунной недостаточности, под которым понимают «нарушения иммунной системы, развивающиеся в позднем постнатальном периоде или у взрослых и характеризующиеся хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями, торпидными к традиционной стандартной терапии» [4]. Особую проблему представляют дети

с внутриутробной инфекцией, иммунная система которых еще до рождения подвергается сильной антигенной нагрузке. Несмотря на самые современные антибиотики, лечение таких больных, к сожалению, не всегда бывает успешным и одна из причин этого — несвоевременная или неполная диагностика всего спектра патогенов.

Потребность клиницистов в новых высокоинформативных методах лабораторной диагностики привела к тому, что за последние 10—15 лет многие технологии, применявшиеся в научно-исследовательских лабораториях, стремительно вошли в практику здравоохранения. Иммуноферментный анализ (ИФА), реакция иммунофлюоресценции (РИФ), полимеразная цепная реакция (ПЦР) стали неотъемлемой частью протокола исследований при большинстве заболеваний инфекционной природы.

Вместе с тем, далеко не все врачи знают о возможностях данных методик и не всегда могут правильно интерпретировать результаты исследований, а это в свою очередь приводит к диагностическим ошибкам и неадекватному лечению. Особенно печально, когда такие случаи происходят в педиатрии.

Поэтому, на наш взгляд, клиницисты должны иметь представление об основных принципах лабораторных методик, их преимуществах и недостатках.

Молекулярно-биологические методы исследований основаны на выявлении ДНК или РНК изучаемого объекта посредством амплификации и/или гибридизации целевых полинуклеотидных последовательностей — фрагментов ДНК (template). Наиболее широко в нашей стране применяется ПЦР и ее различные модификации [5—7]. Принцип ПЦР заключается в том, что с помощью специально синтезированных коротких олигонуклеотидных последовательностей наиболее специфичных участков генома изучаемого биологического объекта, которые называются праймерами, при определенных условиях *in vitro* происходит увеличение участка генома объекта, содержащегося в исследуемом образце в геометрической прогрессии. Эти полинуклеотидные последовательности потом можно детектировать чаще всего путем электрофореза в агарозном геле. ПЦР-тест-системы имеют следующие аналитические характеристики:

1) диагностическая чувствительность — число положительных реакций в %, зарегистрированных при тестировании образцов от больных контрольной группы (92—98%);

2) диагностическая специфичность — число отрицательных реакций в %, зарегистрированных при тестировании образцов от больных контрольной группы (инфекции другой этиологии, здоровые лица) (96—97,9%).

Преимущества ПЦР: высокая чувствительность и специфичность, сравнительная быстрота выполнения анализа (6—10 ч), минимальный объем проб и реактивов, детекция возбудителей, которые не культивируются или трудно культивируются, возможность автоматизации, компьютеризации и проведения контроля качества на разных этапах исследования, возможность транспортировки и длительного хранения проб, возможность проведения массовых скрининговых исследований.

Недостатки ПЦР: высокая частота слабopоложительных результатов (примерно 10%), небольшой выбор стандартизированных коммерческих тест-систем, как правило импортных, и их высокая стоимость (в большинстве случаев отечественные лаборатории работают на так называемых «доморощенных» тест-системах, требующих дополнительной адаптации к условиям клинической практики; в первую очередь это относится к праймерам, хотя цена этих тест-систем вполне доступная), жесткие санитарно-гигиенические требования к помещениям и организации производственного процесса в ПЦР-лаборатории, большая зависимость результата от строгого соблюдения всей технологии, начиная от правильного забора материала, качества транспортной среды и условий транспортировки и хранения образцов.

Ложноотрицательные результаты могут встречаться из-за различий в биоvарах возбудителя, неуч-

тенных при конструировании праймеров, из-за ингибирования реакции, например, вследствие гемолиза, из-за очень низкого количества возбудителя в образце.

Ложноположительные результаты возникают при контаминации проб в лаборатории, из-за генетического сходства различных видов микроорганизмов или при обследовании больного вскоре после лечения (считается, что генетический материал в виде фрагментов ДНК нежизнеспособных микроорганизмов может выявляться приблизительно в течение месяца после элиминации возбудителя).

В одной из модификаций данного метода — *гнездовой ПЦР (nested PCR)* — используют 2 пары праймеров, что значительно повышает его чувствительность [8], так как образуется большое количество конечного продукта и, таким образом можно обнаружить единичные молекулы ДНК-мишени. Однако при этом повышается риск ложноположительных результатов из-за случайной контаминации образца.

В идеале после ПЦР должно идти секвенирование полученного ПЦР-продукта (ампликона), то есть определение нуклеотидных последовательностей продукта реакции и сравнение их с нуклеотидными последовательностями эталонных штаммов. Но в настоящее время для широкой практики этот метод остается недоступным.

Еще одна модификация ПЦР в режиме *реального времени (real-time PCR)* позволяет не только идентифицировать микроорганизм, но и определять стартовое количество возбудителя в пробе. Это особенно актуально для мониторинга течения и эффективности терапии таких социально значимых заболеваний, как ВИЧ-инфекция и вирусные гепатиты. Данный метод используется в крупных научно-диагностических центрах и, вероятно, в ближайшие годы войдет в широкую практику [9].

В своей работе врачу следует обращать внимание на следующие моменты при использовании лабораторных методов для диагностики инфекционного заболевания:

• **Выбор объекта исследования.** От правильного выбора объекта исследования зависит вся последующая тактика ведения больного. *Клетки крови* служат резервуаром для многих вирусов и внутриклеточных микроорганизмов, но их концентрация здесь нередко бывает значительно меньше, чем в основном очаге, и может оказаться ниже предела чувствительности лабораторного метода. Так, хотя установлено, что хламидии персистируют в моноцитах, определение их ДНК в этих клетках не является приемлемым маркером острого респираторного хламидиоза. В то же время исследование *жидкости бронхо-альвеолярного лаважа* оказывается весьма информативно [1]. При нейроинфекциях в качестве объекта исследования целесообразно брать *спинно-мозговую жидкость*. Следует отметить, что в крови возбудители выявляются, в основном, при генерализованных формах инфекции, при выраженной иммуносупрес-

сии (например, цитомегаловирусная инфекция после трансплантации почки), а также при внутриутробной инфекции [2, 10]. В ряде случаев при урогенитальной патологии хламидии могут персистировать в маточных трубах, в спайках, но при этом в соскобах из нижних отделов урогенитального тракта они не обнаруживаются [11]. По некоторым данным частота выявления *Chl. trachomatis* методом ПЦР у женщин составляет 22,5% при исследовании материала из цервикального канала, 29% — из влагалища и 14% — из уретры, поэтому для диагностики урогенитальных инфекций желательнее брать материал из нескольких точек [12].

Большое значение имеет то, как был взят образец. Неправильная техника забора может привести к тому, что инфицированные клетки не попадут в исследуемую пробу, либо избыточное количество посторонних примесей (гной, кровь и др.) будет затруднять дальнейшее исследование. Неправильная транспортировка и хранение образца также негативно влияют на результат анализа. Так, уже упоминалось, что гемолиз приводит к ингибированию ПЦР. При повторных замораживаниях и размораживаниях снижается уровень специфических антител.

• **Выбор метода и сроков исследования.** Применительно к инфекционной патологии лабораторные исследования можно разделить на *методы прямой детекции патогена* (РИФ, ПЦР, иногда ИФА) и *косвенные*, при которых определяется уровень специфических антител к данному возбудителю (ИФА, реже — РИФ).

Говоря о *серологических исследованиях*, следует помнить о том, что многие внутриклеточные микроорганизмы являются слабыми иммуногенами, то есть антительный ответ на них развивается недостаточно. Поэтому, при персистирующих, латентных инфекциях, когда возбудитель не размножается и не выходит из клеток, антител может не быть [13]. Как правило, серологические методы целесообразно использовать при наличии распространенных воспалительных процессов, когда массивная антигенная нагрузка приводит к выработке достаточного количества антител, а также для диагностики внутриутробных инфекций (исследование парных сывороток матери и плода) [11, 14, 15].

РИФ, по мнению ряда авторов [11, 14], нельзя использовать для контроля эффективности лечения хламидиоза, так как, во-первых, липополисахарид и белки наружной мембраны хламидии могут достаточно долго оставаться в организме хозяина и «светиться» даже после элиминации возбудителя, а во-вторых, под влиянием антибиотиков возбудитель может модифицироваться, переходить в персистентную форму и не идентифицироваться специфическими моноклональными антителами. Этот метод наиболее приемлем для диагностики острых форм инфекции.

Молекулярно-генетические методы пригодны как для диагностики манифестных форм инфекции,

так и для латентных, субклинических форм, когда отмечается длительная персистенция возбудителя [1, 5, 7, 11, 14, 16]. При этом следует помнить, что обнаружение генетического материала возбудителя служит лишь свидетельством инфицирования, но не наличия инфекционного заболевания. Другими словами, эти методы не являются безусловным доказательством этиологической значимости выявленного возбудителя в патологическом процессе. В то же время ПЦР очень подходит для массовых скрининговых исследований, для эпидемиологического анализа [5, 7].

Мы провели скрининговое обследование детей, находившихся на стационарном лечении в МОНКИ, на частоту выявления атипичных микроорганизмов методом ПЦР. Широкое распространение в популяции таких патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, как *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Cytomegalovirus (CMV)*, *Ureaplasma urealyticum*, послужило поводом для обследования детей с хирургической и соматической патологией молекулярными методами (ПЦР) с целью выявления факторов, отягощающих течение основного заболевания. Было обследовано 105 детей в возрасте от одного дня до 14 лет, в основном, новорожденные и дети раннего возраста. ПЦР-диагностику проводили детям с врожденными пороками развития, острой и хронической бронхолегочной патологией, артритом, а также при затяжном течении гнойно-воспалительных заболеваний. У 69,1% детей с хирургической патологией выявлены положительные результаты ПЦР, а у 28,4% обнаружена ДНК нескольких видов возбудителей. В группе детей с бронхолегочной патологией (45 больных) в 52,6% случаев выявлен CMV, который наиболее часто встречался у детей с острой деструктивной пневмонией (72,7%). ДНК CMV обнаружили у 2 детей с атипично протекающей клинической картиной острого гематогенного остеомиелита, выраженной гепатомегалией. В 45,4% была детектирована ДНК *M. pneumoniae*, в 41,7% — *C. trachomatis* (преимущественно у детей с артритом). Это дает возможность предположить, что персистирующие микроорганизмы и вирусы, а также их смешанные варианты играют существенную роль в этиологии заболеваний данной нозологической группы. Молекулярное тестирование с помощью ПЦР новорожденных с пороками развития показало, что в 67,6% имеет место внутриутробное инфицирование. Так, например, при атрезии пищевода, ануса, тонкой кишки в 50—55,6% случаев обнаружено наличие в организме детей *C. trachomatis*, *M. pneumoniae*, *Ureaplasma spp.*, HSV I, II типов. При атрезии желчевыводящих путей и желтухе неясной этиологии в 100% случаев выявлен CMV. ПЦР-тестирование на наличие ДНК *Candida albicans* у 20 детей позволило своевременно назначить противогрибковые препараты 9 из них. При острых и хронических пиелонефритах и гломерулонефритах у 13 детей в возрасте от 1,5 до

14 лет в 40% случаев были обнаружены специфические фрагменты ДНК *M. hominis*, *U. urealyticum*, *G. vaginalis*; причем *M. hominis* и *G. vaginalis* встречались, по нашим данным, только у девочек, больных пиелонефритом. ДНК CMV и HSV I, II типов была обнаружена у 2 детей, больных пиелонефритом. Клинический материал, полученный от детей с острыми и хроническими формами гломерулонефрита, не содержал ДНК ни одного из вышеперечисленных патогенов.

Полученные данные свидетельствуют о достаточно высокой частоте встречаемости атипичных микроорганизмов (преимущественно в виде микстинфекций) у детей с различной патологией, требующей лечения в условиях стационара. Однако, учитывая ограниченность выборки и специфику обследованного контингента, нельзя считать, что полученные данные отражают истинную картину частоты инфицирования детей данными микроорганизмами. Было бы целесообразно провести широкомасштабные исследования в нескольких районах Московской области на амбулаторных контингентах (практически здоровые и длительно и часто болеющие дети). Поскольку «оппортунистические» инфекции ассоциируются с иммунной недостаточностью необходимо обязательное исследование иммунного статуса с последующей иммунореабилитацией и иммунопрофилактикой. Результаты такого исследования были бы весьма актуальны для совершенствования организации медицинской помощи детям Московской области.

• **Интерпретация результатов.** Несмотря на достаточно высокую информативность ПЦР, при интерпретации ее результатов нередко возникают сложности, особенно если больной неоднократно обследовался в разных лабораториях различными методами. Чем

можно объяснить такие расхождения? О причинах ложноположительных и ложноотрицательных результатов было сказано выше. Наличие антител при отрицательных результатах прямой иммунофлюоресценции (ПИФ) или ПЦР может быть связано с ранее перенесенной инфекцией («антитела-свидетели») либо с локализацией возбудителя в органах, недоступных для взятия материала. Отсутствие антител на фоне положительной ПИФ или ПЦР может указывать на самое начало инфекционного процесса, когда антительный ответ еще не развился, на латентную инфекцию, а также может быть следствием иммуносупрессии или слабой иммуногенности возбудителя.

Поэтому в настоящее время многие специалисты [1, 5, 11, 14] сходятся на том, что для верификации диагноза необходимо использовать комплекс методов лабораторной диагностики. Только в этом случае они будут существенным подспорьем для врача-клинициста в самых различных областях медицины. Еще большие возможности открывают методики, которые будут внедрены в клиническую практику в самое ближайшее время. Но чтобы правильно пользоваться таким инструментом, необходимо иметь представление о преимуществах, недостатках и «подводных камнях» этих методов. Нередко в алгоритм обследования больного приходится включать несколько лабораторных тестов. К сожалению, применение не сертифицированных тест-систем, нарушение правил забора, хранения, транспортировки материала и самой методики, недостаточный профессионализм врачей-лаборантов вносят большую путаницу в интерпретацию результатов. Поэтому постановка диагноза всегда должна проводиться с учетом клинико-anamnestических данных и результатов других видов исследований [17], а в терапевтической тактике следует не переходить той грани, когда начинают лечить анализы, а не больного.

ЛИТЕРАТУРА

См. online-версию журнала <http://www.pediatricjournal.ru> № 5/2006, приложение № 7.

© Коллектив авторов, 2006

О.Н. Комарова¹, Н.М. Шилина¹, Н.Н. Погосий², Т.С. Окунева²,
Ю.А. Мизерницкий², И.Я. Конь¹

РОЛЬ ЛЕЙКОТРИЕНОВ 4 И 5 В ПАТОГЕНЕЗЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

¹ ГУ НИИ питания РАМН,

² ФГУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Росздрава», Москва

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии исследованы спектр и уровень высвобождения лейкотриенов (ЛТ) 4-й и 5-й серии из лейкоцитов периферической крови у 71 ребенка в возрасте 7—12 лет, страдающих бронхиальной астмой (БА) различной тяжести, и у 8 их условно

О.В. Москалец, А.Е. Машков, Е.З. Друзюк, Ю.А. Бурдакова,

В.И. Щербина, О.Ю. Манзенюк

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцева О.В., Щербакова М.Ю., Самсыгина Г.А. // Тер. архив.— 2001.— № 11.— С. 35—39.
2. Каражас Н.В. // Педиатрия.— 1999.— № 1.— С. 16—17.
3. Кузьменко Л.Г., Соколов А.Л., Капустин И.В. и др. // Педиатрия.— 1999.— № 1.— С. 15—20.
4. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. // Иммунология.— 2000.— № 5.— С. 4—7.
5. Гинзбург А.Л., Романова Ю.М. // Педиатрия.— 1999.— № 1.— С. 35—38.
6. Манзенюк О.Ю., Москалец О.В., Бурдакова Ю.А., Сучков С.В. // Биопрепараты. — 2002. — № 3.— С. 16—18.
7. Щербо С.Н., Макаров В.Б. // Клин. лаб. диагностика.— 1998.— № 2.— С. 21—24.
8. Lan J., Ossewaarde J.M., Walboomers J.M. et al. // J. Clin. Microbiol. — 1994.— Vol. 32, № 3.— P. 528—530.
9. Heid C.A., Stevens J., Livac K.J. et al. // Genome Res.— 1996.— № 6.— P. 986—994.
10. Малкова Е.М., Помогаева А.П., Кравец Е.Б. и др. // Педиатрия.— 2002.— № 1.— С. 36—44.
11. Адаскевич В.П. Инфекции, передаваемые половым путем.— Н. Новгород; М., 2001.
12. Савичева А.М., Башмакова М.А. Урогенитальный хламидиоз у женщин и его последствия.— Н.Новгород, 1998.
13. Ярилин А.А. Основы иммунологии.— М., 1999.
14. Еремин В.Ф., Барабанов Л.Г., Гасич Е.Л. и др. // Диагностика ИППП.— 2002.— № 2.— С. 22—29.
15. Нисевич Л.Л., Талалаев А.Г., Каск Л.Н. и др. // Педиатрия.— 1999.— № 1.— С. 4—10.
16. Chernensky M.A. // FEMS Immun. Med. Microbiol.— 1999.— Vol. 24, № 4.— P. 437—446.
17. Москалец О.В., Палеев Ф.Н., Котова Т.Е. и др. // Клин. мед.— 2002.— № 11.— С. 18—23.