

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ У ДЕТЕЙ КИШЕЧНЫХ МОНО- И МИКСТ-ИНФЕКЦИЙ НА ОСНОВЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОПРОТОЧНЫХ КАРТ

Семейко Г. В.¹, Ермолович М. А.¹, Кастюкевич Л. И.², Романова О. Н.², Самойлович Е. О.¹

¹Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Республика Беларусь;

²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. С использованием микропроточных карт TaqMan Array Card, позволяющих одновременно определять множество возбудителей в одном образце на основе количественной ПЦР в реальном времени, исследованы образцы стула от 107 детей в возрасте 1 мес — 5 лет с острыми кишечными инфекциями (ОКИ). Этиология заболевания была установлена у 77,6 % (83/107) детей. Всего было выявлено 12 энтеропатогенов, среди которых *Rotavirus* (57,9 %), *Norovirus* (14,0 %) и *Campylobacter* (7,5 %) являлись наиболее часто встречающимися. Среди детей с установленной этиологией заболеваний у 61 (73,5 %) была выявлена моноинфекция, у 22 (26,5 %) — микст-инфекция, когда в образце выявлялось одновременно 2 или 3 возбудителя. Выявлена зависимость степени тяжести заболевания от количества выявленных возбудителей.

Ключевые слова: острые кишечные инфекции, микст-инфекции, ротавирус, диагностика.

Введение. Острые диарейные, или кишечные инфекции — это группа полиэтиологических заболеваний, объединенных единым механизмом передачи возбудителя и симптомами поражения желудочно-кишечного тракта. Эти заболевания являются одной из основных причин болезней и смерти детей в возрасте до 5 лет, особенно в странах с низким уровнем доходов, и вызывают более 500 тыс. смертей в год во всем мире [1].

Этиологическая структура ОКИ чрезвычайно разнообразна. Она включает более 30 нозологических форм, этиопатогенами могут быть бактерии, вирусы, простейшие, гельминты. В силу полиэтиологичности данных заболеваний их диагностика является сложной, однако своевременная этиологическая верификация чрезвычайно важна, от ее результатов зависят объем, характер и эффективность проводимых клинических и противоэпидемических мероприятий.

Трудности, а зачастую невозможность выявления всех возможных патогенов в каждом конкретном случае ОКИ при применении традиционных методов обследования (бактериологический метод, ИФА), ограничивают расшифровку этиологического диагноза. Улучшение этиологической диагностики кишечных инфекций, особенно смешанной этиологии, связано с применением молекулярных методов верификации патогенов [2]. Количественная ПЦР стала золотым стандартом диагностического подхода для определения причин диареи [3]. Применение ее мультиплексного варианта позволяет одновременно проводить обнаружение генетического материала нескольких (2–5) патогенов.

Революционная разработка последнего десятилетия — микропроточные TaqMan Array Cards (TAC) карты, которые позволяют одновременно определять множество возбудителей в одном образце на основе количественной

ПЦР в реальном времени [4]. Карта представляет собой 384-луночную планшету, в лунки которой предварительно загружены лиофилизированные праймеры и зонды. Одна карта предназначена для исследования 8 образцов в 48 лунках с тестированием одной или двух мишеней в каждой из лунок. Впервые ТАС-карты были использованы для исследования экспрессии генов человека в 2006 г., но значительно более широкое применение получили карты, разработанные для детекции возбудителей респираторных и кишечных инфекций, гнойных менингитов, лихорадок, гепатитов и др. [5, 6].

Поскольку при использовании методов молекулярного тестирования бессимптомная идентификация генетического материала патогенов является частым явлением, работы международного уровня последних лет были направлены на определение количественных порогов обнаружения нуклеиновых кислот энтеропатогенов с целью определения их этиологической значимости. Так, в работе, опубликованной в 2016 г., J. Liu с соавт. была использована модель, разработанная на основе анализа более 5300 пар образцов фекалий, собранных у детей с диареей и без диареи (случай-контроль) в рамках Глобального многоцентрового исследования кишечных заболеваний (Global Enteric Multicenter Study — GEMS) и исследованных в количественной ПЦР с использованием микропроточных карт на 32 патогена в сравнении с результатами, полученными с помощью классических микробиологических методов, ИФА и ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией [6]. Двумя годами позднее, в 2018 г., J. Platts-Mills с соавт. опубликовал результаты исследования 6625 образцов диарейных фекалий и 31 000 образцов фекалий от 1715 детей без диареи в рамках когортного исследования новорожденных «Взаимосвязь кишечных инфекций и недоедания и последствия для здоровья и развития детей» (MAL-ED) в количественной ПЦР с использованием микропроточных карт и вывели строгие количественные критерии для определения этиологической значимости энтеропатогенов [7]. Используя модель условной логистической регрессии (GEMS) и обобщенную линейную модель смешанных эффектов (MAL-ED), для каждого патогена была подобрана персональная модель для описания связи между количеством возбудителя и диареей, а также определены пороговые значения для оценки результатов.

Как следует из анализа данных литературы, к настоящему времени только появляются первые публикации по результатам применения количественной ПЦР в реальном времени с использованием микропроточных карт, однако даже небольшой опыт применения данного метода свидетельствует о его большой перспективности. Несмотря на то что он является достаточно дорогостоящим, требует тщательной подготовки (деконтаминации) лаборатории перед исследованием, проведения серьезного биоинформационного анализа полученных результатов, метод дает возможность одномоментного исследования на большой перечень энтеропатогенов и является незаменимым в диагностике тяжелых ОКИ, в том числе имеющих смешанную этиологию.

В данной работе мы представляем первые результаты использования данного метода в Республике Беларусь для оптимизации этиологической диагностики кишечных моно- и микст-инфекций.

Материалы и методы. В исследование включено 107 пациентов с ОКИ в возрасте 1 месяц — 5 лет (средний возраст 1 год 7 месяцев), госпитализированных в Городскую детскую инфекционную клиническую больницу г. Минска (ГДИКБ), которые при поступлении наряду с гастроинтестинальным синдромом имели общеинфекционный синдром.

У всех пациентов проведен забор крови и выполнено общеклиническое обследование, а также проведен забор образцов фекалий (не менее 0,5 г или 0,5 мл) для исследования в количественной ПЦР с использованием микропроточных карт, выполнена доставка образцов в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, где до начала исследования они хранились замороженными при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Выделение тотальной нуклеиновой кислоты (РНК и ДНК) проводили с использованием набора QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Германия) с модификациями, включавшими предварительное механическое измельчение пробы при помощи стеклянных бусин и дополнительный этап инкубации в течение 5 мин при $95\text{ }^{\circ}\text{C}$.

В качестве внешних контролей экстракции ДНК и РНК во все образцы вносили вирус герпеса туленей (Phocine Herpes virus) и фaг MS2 соответственно. Каждая партия образцов для экстракции также включала одну пробу отрицательного контроля для мониторинга загрязнения.

Детекцию ДНК/РНК кишечных патогенов выполняли с использованием набора реагентов AgPath-ID One Step RT-PCR Reagents (Applied Biosystems, США) на 384-луночных микропроточных картах TaqMan Array Card (Applied Biosystems, США). Каждый образец был исследован на наличие 34 патогенов, способных вызывать диарею, включая:

– вирусы: *Adenovirus*, *Astrovirus*, *Norovirus*, *Rotavirus*, *Sapovirus*;

– бактерии: *Aeromonas*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* (EAEC, ETEC, EPEC, STEC), *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Plesiomonas*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*;

– простейшие: *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia*, *Isopora*, *Microsporidia* (*Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*);

– гельминты: *Ancylostoma*, *Ascaris*, *Necator*, *Hymenolepis nana*, *Schistosoma*, *Strongiloides*, *Trichuris*.

Анализ данных выполняли с помощью лицензионного программного обеспечения QuantStudio 7 Real-Time PCR software v 1.3 (Life Technologies, США) со стандартизованными пороговыми значениями флуоресценции. Согласно инструкции разработчика образцы со значением порогового цикла (Ct) менее 35 считались положительными. Отрицательными результаты засчитывались только тогда, когда соответствующий внешний контроль был положительным. Положительными результаты засчитывались только тогда, когда соответствующий отрицательный контроль экстракции был отрицательным.

Результаты и их обсуждение. Проведенное исследование 107 образцов фекалий от детей с ОКИ с использованием микропроточных карт TaqMan Array Card при значении порогового цикла (Ct) менее 35 позволило обнаружить генетический материал 16 кишечных патогенов. В частности, были выявлены следующие возбудители: вирусы — *Adenovirus* 40/41, *Astrovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus*, *Rotavirus*; бактерии — *Aeromonas*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella flexneri*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* (ETEC — энтеротоксигенная *E. coli*, EPEC — энтеропатогенная *E. coli* (tEPEC — типичная bfaA+/eae+ и aEPEC — атипичная bfaA-/eae+), EAEC — энтероагрегативная *E. coli*, STEC — шигатоксин-продуцирующая *E. coli*); простейшие — *Blastocystis* (рисунок 1). Кишечные патогены были обнаружены в 92 из 107 (86,0 %) исследованных образцов фекалий, в 15 (14,0 %) образцах ни одного возбудителя идентифицировано не было.

Анализ частоты выявления генетического материала энтеропатогенов показал, что наиболее частой находкой являлся *Rotavirus* (выявлен в 65 из 107 образцов (60,7 %)). Следующими по частоте выявления оказались *Norovirus* (20/18,7 %) и *Campylobacter* (15/14,0 %). Значимую долю составляли aEPEC (9/8,4 %), *Salmonella* и *Sapovirus* (по 7/6,5 %), а также *Clostridium difficile* и *Bacteroides fragilis* (по 6/5,6 %). Остальные возбудители

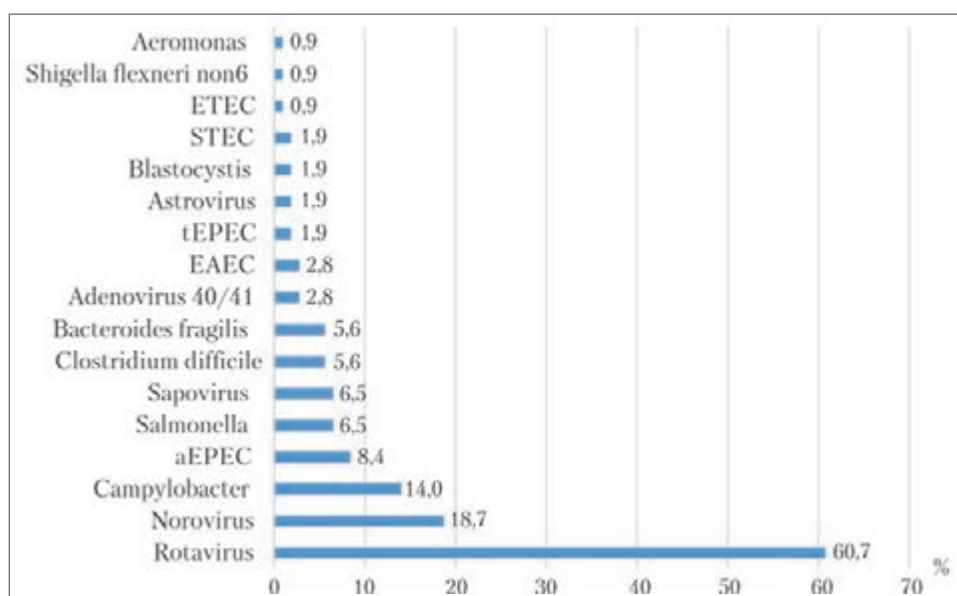


Рисунок 1 — Частота выявления различных кишечных патогенов у пациентов с диареей (при значении Ct менее 35)

встречались существенно реже и были обнаружены у 1–3 % обследуемых. При этом практически у половины обследованных, у которых в образцах фекалий был обнаружен генетический материал возбудителя (46/92; 46,7 %), одновременно выявлялось от 2 до 4 энтеропатогенов.

Определение количественных параметров содержания генетического материала возбудителей в образце фекалий. Принимая во внимание тот факт, что ПЦР в различных ее модификациях обладает высокой чувствительностью и выявленный в пробе стула пациента с диареей в малых количествах генетический материал патогена не всегда указывает на его этиологическую роль в развитии диареи, нами были предприняты попытки дифференцировать этиологически значимые энтеропатогены среди всех 16, генетический материал которых был выявлен в образцах фекалий с диареей. Для этого мы воспользовались как результатами других исследователей, так и собственным опытом.

В таблице представлены результаты двух исследований, в рамках которых с использованием моделей условной логистической регрессии [6] и обобщенной линейной модели смешанных эффектов [7] для каждого выявленного энтеропатогена была подобрана персональная модель описания связи между его

количеством и диареей, а также определены пороговые значения (cut off) для учета результатов. Как следует из таблицы, в более позднем исследовании [7] пороговые значения выявленных энтеропатогенов, указывающие на их этиологическую роль, были несколько ниже, чем в предыдущем [6]. Поскольку нами применялся тот же метод исследования (количественная ОТ-ПЦР с использованием микропроточных карты), для интерпретации результатов мы воспользовались количественными критериями оценки, полученными в более позднем исследовании [7].

После анализа полученных нами результатов с использованием откорректированного на основании последних данных литературы количественного порога в определении роли возбудителя в развитии диареи мы получили следующие результаты. Этиологически значимые возбудители кишечных инфекций были обнаружены в 83 из 107 (77,6 %) образцов, количество случаев диареи с неустановленной этиологией составило 24 (22,4 %). Таким образом, общее количество выявленных патогенов уменьшилось на 4 и составило 12.

К этиологически незначимым находкам по причине обнаружения незначительного количества их генетического материала с большой долей вероятности было отнесено выявление следующих патогенов (*Sapovirus*

Таблица — Количественные параметры и пороговые значения для определения этиологии, полученные в рамках исследований GEMS и MAL-ED [6, 7]

Патоген	Количество, связанное с диареей (GEMS) (13)		Количество, связанное с диареей (MAL-ED) (14)	
	Cq	Кол-во копий	Cq	Кол-во копий
Adenovirus 40/41	35,0	$2,5 \times 10^5$ копий/г	24,0	$9,9 \times 10^7$ копий/г
Astrovirus	25,5	$4,8 \times 10^8$ копий/г	23,7	$1,9 \times 10^9$ копий/г
Norovirus GII	27,6	$1,1 \times 10^8$ копий/г	27,2	$1,7 \times 10^8$ копий/г
Rotavirus	35,0	$1,5 \times 10^5$ копий/г	31,7	$1,9 \times 10^6$ копий/г
Sapovirus	31,6	$9,4 \times 10^5$ копий/г	26,1	$1,5 \times 10^7$ копий/г
Campylobacter jejuni/coli	19,7	$2,5 \times 10^7$ копий/г	21,8	$2,6 \times 10^8$ копий/г
ST-EPEC (STh)	26,2	$2,0 \times 10^7$ копий/г	23,5	$1,3 \times 10^8$ копий/г
tEPEC	19,5	$2,7 \times 10^9$ копий/г	17,8	$1,7 \times 10^9$ копий/г
Helicobacter pylori	30,8	$3,6 \times 10^5$ копий/г	н/д	—
Salmonella	32,4	$2,2 \times 10^5$ копий/г	н/д	—
Shigella	33,1	$2,1 \times 10^6$ копий/г	28,8	$6,2 \times 10^5$ копий/г
Vibrio cholerae	34,9	$7,3 \times 10^3$ копий/г	32,0	$5,1 \times 10^5$ копий/г
Cyclospora cayetanensis	29,6	$3,7 \times 10^5$ копий/г	н/д	—
Cryptosporidium	29,1	$1,8 \times 10^6$ копий/г	22,0	$3,3 \times 10^8$ копий/г
Iso spora	н/д	—	33,8	$5,8 \times 10^3$ копий/г
Strongyloides	н/д	—	30,4	$2,0 \times 10^4$ копий/г
Entamoeba histolytica	34,8	$4,6 \times 10^6$ копий/г	30,0	$9,4 \times 10^6$ копий/г

(Ст 27,6–33,9), ЕТЕС (Ст 21,8), *Shigella* (Ст 31,7) и *Aeromonas* (Ст 34,9). В наибольшей степени уменьшилась частота выявления *Campylobacter* и аЕПЕС — на 6,5 %, *Norovirus* — на 4,7 %, *Rotavirus* — на 2,8 %. В итоге пересмотра результатов с использованием откорректированного количественного порога 3 наиболее часто встречающиеся возбудителя остались прежними: *Rotavirus* (выявлен в 62 из 107 образцов (57,9 %), *Norovirus* (15/14,0 %) и *Campylobacter* (8/7,5 %). Нередко встречались *Clostridium difficile* (6/5,6 %), *Salmonella* (5/4,7 %) и *Bacteroides fragilis* (4/3,7 %). Остальные возбудители встречались существенно реже и были обнаружены у 1–2 % обследуемых (рисунок 2).

Если при анализе полученных результатов, когда к положительным относились все выявленные энтеропатогены, показавшие значение Ст менее 35, в одном образце фекалий могло быть выявлено до 4 возбудителей, то при использовании откорректированного количественного порога в образце выявлялись одновременно не более 3 возбудителей. Доля образцов, где одновременно выявлялось несколько возбудителей, уменьшилась на 19,6 % (с 43/40,2 % до 22/20,6 %), и, соответственно, увеличилась на 11,2 % доля образцов, где выявлялся только один возбудитель (с 49/45,8 % до 61/57,0 %), либо этиология не была установлена (с 15/14,0 % до 24/22,4 %) (рисунок 3).

Согласно скорректированным результатам у 61 (57,0 %) из 107 обследованных пациентов с диареей была выявлена моноинфек-

ция. У 56/107 (52,3 %) были обнаружены возбудители вирусных инфекций (*Rotavirus* — 45/107 (42,1 %) и *Norovirus* — 11/107 (10,3 %) и у 5/107 (4,7 %) — бактериальных (*Salmonella* и *Clostridium difficile* — по 2/107 (1,9 %) и *Campylobacter* — 1/107 (0,9 %).

Микст-инфекция была выявлена у 22/107 (20,6 %) заболевших, при этом с наибольшей частотой обнаруживались комбинации «вирус+бактерии» — у 15/107 (14,0 %) детей. Наиболее частыми сочетаниями были *Rotavirus* + *Campylobacter* (4), *Rotavirus* + *Bacteroides fragilis* (2) и *Rotavirus* + *Salmonella* (2). Значительно реже встречались такие сочетания, как бактериальная микст-инфекция (у 3/2,8 %), вирусная микст-инфекция и вирусно-паразитарная (по 2/1,9 %) (рисунок 3). Среди вирусных микст-инфекций это были *Rotavirus* + *Norovirus* (2), среди вирусно-паразитарных — *Rotavirus* + *Blastocystis* (2).

В соответствии с клиническими данными среди 107 включенных в исследование госпитализированных с диареей детей, у 44 (41,1 %) она протекала в среднетяжелой форме, у 34 (31,8 %) — в тяжелой и у 29 (27,1 %) — в легкой. Проведенный анализ спектра выявленных возбудителей у 83 заболевших с установленной этиологией заболевания в зависимости от тяжести клинической картины показал следующее. Доля лиц, инфицированных одним возбудителем, в целом составляла 73 % (61/83), при этом в группе с легким течением она являлась наибольшей (81 %), а с увеличением тяжести заболевания снижалась до 74 и 67 % в группе со среднетяжелым и тяжелым

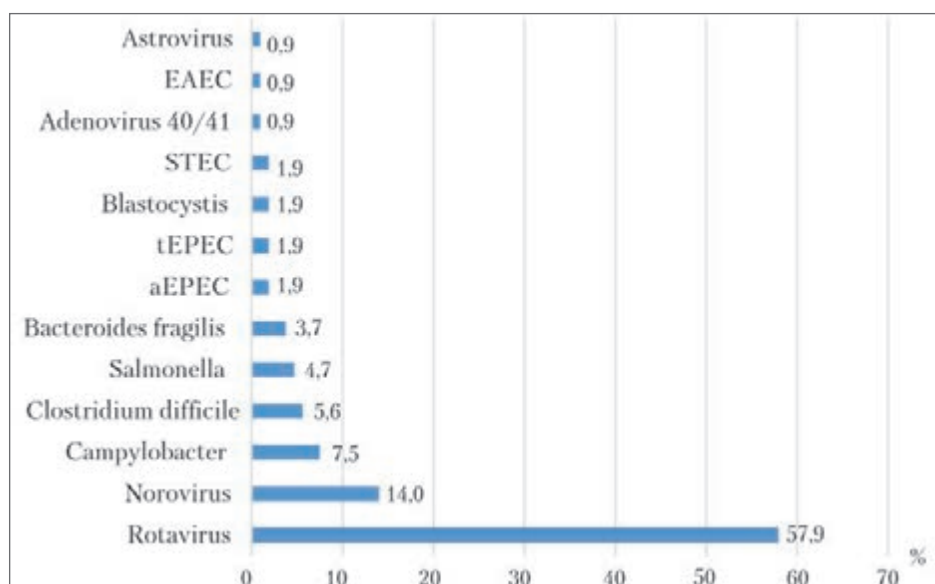


Рисунок 2 — Частота выявления кишечных патогенов у детей с диареей при учете результатов с откорректированным количественным порогом

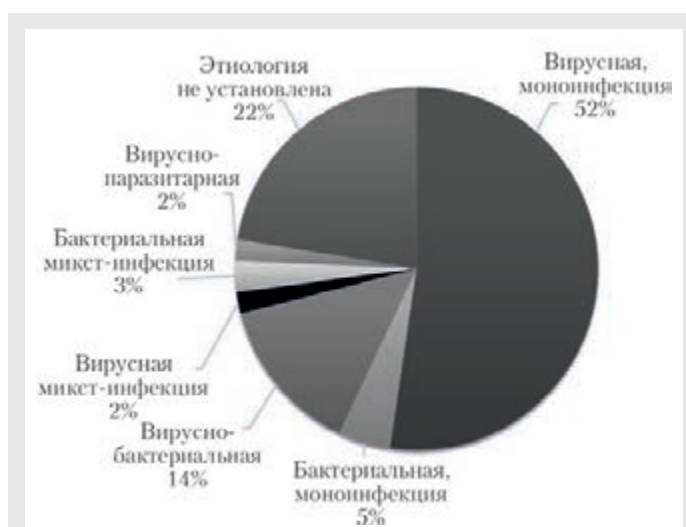


Рисунок 3 — Сочетания возбудителей, выявленные при моно- и микст-инфекции

течением соответственно. Таким образом, у каждого пятого ребенка (19 %) в группе с легким течением заболевание было вызвано 2 или 3 патогенами, у каждого четвертого (26 %) — в группе со средней тяжестью и у каждого

третьего (33 %) в группе с тяжелым течением (рисунок 4).

Заключение. Проведенное исследование с применением новейшего подхода к диагностике заболеваний, протекающих с диареей у детей, позволило обеспечить одномоментное обнаружение возбудителей вирусной, бактериальной и протозойной природы. С учетом международного и собственного опыта применения TaqMan Array Card для исследования проб фекалий от детей с диареями и без диарей для каждого из выявляемых энтеропатогенов были определены количественные маркеры (значения Ct), позволяющие относить их к этиологически значимым либо не имеющим этиологического значения. Этиология заболевания была установлена у 83 из 107 (77,6 %) детей с диареей. Среди детей с установленной этиологией заболеваний у 61 (73,5 %) была выявлена моноинфекция, у 22 (26,5 %) — микст-инфекция. Выявлена зависимость степени тяжести заболевания от количества определяемых в образцах фекалий возбудителей.

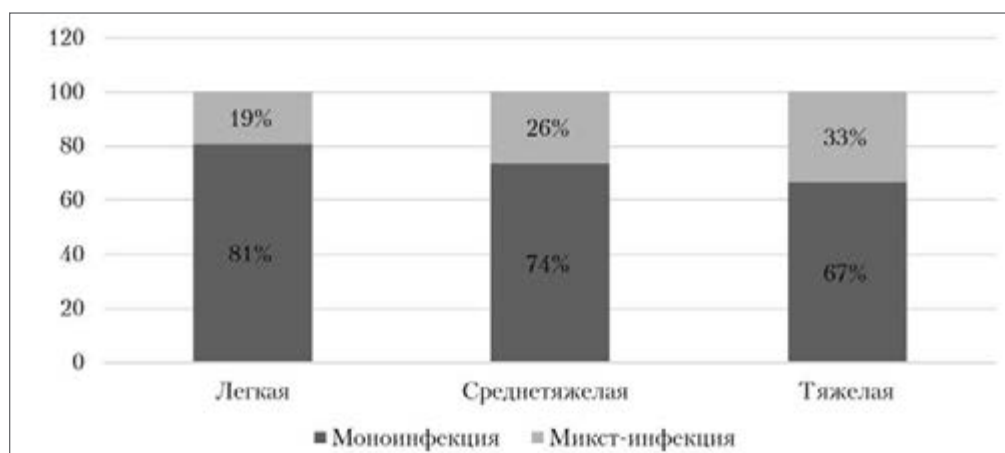


Рисунок 4 — Зависимость степени тяжести заболевания от количества выявленных возбудителей в образце

Список цитированных источников

1. Estimates of global, regional and national morbidity, mortality and aetiologies of diarrheal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 GBD Diarrheal Diseases Collaborators // *Lancet Infect Dis.* — 2017. — Vol. 17, №9. — P. 909–948.
2. Клинико-патогенетические аспекты ротавирусной инфекции / Т. Н. Одинец [и др.] // *Цитокины и воспаление* — 2015. — Т. 14, №4. — С. 35–39.
3. Meeting Report: WHO Workshop on modelling global mortality and aetiology estimates of enteric pathogens in children under five. Cape Town, 28–29th November 2018 / H. J. Prudden [et al.] // *Vaccine.* — 2020. — Vol. 38, № 31. — P. 4792–4800.
4. Low-Density TaqMan Array Cards for the Detection of Pathogens / J. Heaney [et al.] // *Methods in Microbiol.* — 2015. — №42. — P. 199–2018.
5. Application of TaqMan low-density arrays for simultaneous detection of multiple respiratory pathogens / M. Kodani [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2011. — Vol. 49, № 6. — P. 2175–2182.



6. Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study / J. Liu [et al.] // *Lancet*. — 2016. — Vol. 388, № 10051. — P. 1291–1301.

7. Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhoea in children in low-resource settings: a reanalysis of the MAL-ED cohort study / J. A. Platts-Mills [et al.] // *Lancet Glob. Health*. — 2018. — Vol. 6, № 12. — P. 1309–1318.

Optimization of etiological diagnosis of intestinal mono- and mixed infections based on quantitative real-time pcr using taqman array card

Semeiko G. V.¹, Yermalovich M. A.¹, Kastsiukevich L. I.², Romanova O. N.², Samoilovich E. O.¹

*¹Republican Scientific Practical Centre Epidemiology and Microbiology,
Minsk, Republic of Belarus;*

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Stool samples from 107 children aged 1 month - 5 years with acute intestinal infection were tested using TaqMan Array Cards, which allow simultaneous detection of multiple pathogens in one sample based on quantitative real-time PCR. The etiology of the disease was established in 77.6 % (83/107) of children. A total of 12 enteropathogens were identified, among which Rotavirus (57.9 %), Norovirus (14.0 %) and Campylobacter (7.5 %) were the most common. Among children with an established etiology of diseases, 61 (73.5 %) had a mono-infection, 22 (26.5 %) had a mixed infection, when 2 or 3 pathogens were detected in the sample. The dependence of the severity of the disease on the number of pathogens was revealed.

Keywords: acute intestinal infections, mixed infections, rotavirus, diagnostics.

Поступила 16.06.2022