

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРЫХ МЕНИНГИТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ И ВИРУСНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Доц. П. В. НАРТОВ

Харьковская академия последиplomного образования

Показана эффективность полимеразной цепной реакции для выявления в цереброспинальной жидкости *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae b*, *Enterovirus*, *Herpes simplex 1/2*, *Epstein – Barr virus*, *Cytomegalovirus*, *Human herpes virus 6* как метода диагностики острых менингитов, который позволяет значительно повысить частоту расшифровки этиологии гнойных и серозных менингитов.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, цереброспинальная жидкость, гнойный менингит, серозный менингит.

Инфекционные заболевания нервной системы представляют собой особую область клинической медицины, находящуюся на стыке интересов инфекционистов и невропатологов. В структуре общей патологии нервной системы удельный вес инфекции составляет около 40%. При этом менингиты различной этиологии являются наиболее частыми клиническими формами нейроинфекционных заболеваний. Клиническая картина острых менингитов (ОМ) различной этиологии характеризуется, как правило, выраженной тяжестью течения, частотой развития неотложных состояний, высоким процентом летальности [1–4].

По определению В. С. Лобзина [4], под термином «менингит» следует понимать полиэтиологическое инфекционное заболевание, характеризующееся воспалением мягкой мозговой оболочки и сопровождающееся явлениями общей инфекционной интоксикации, синдромом повышенного внутричерепного давления, менингеальным синдромом, а также воспалительными изменениями в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ). Менингиты классифицируются по характеру изменения ЦСЖ, типу возбудителя инфекции, происхождению (первичные, метастатические), течению и анатомической локализации. Наибольшее практическое значение имеет деление менингитов по этиологии заболевания и типу ликворных изменений: гнойные (ГМ) (бактериальные) и серозные (СМ) (чаще вирусные). Формулирование диагноза менингита только по характеру ликвора (гнойный или серозный) без идентификации причины заболевания на сегодняшний момент рассматривается как неудовлетворительная диагностика. Если клинический диагноз менингита чаще всего не представляет для врача особых затруднений, то ранняя расшифровка его этиологии остается в большинстве случаев нерешенной задачей. Этиологической причиной гнойных бактериальных менингитов (БМ), как правило, более чем в 80% случаев являются *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* тип *b*. Одним из частых видов серозных вирусных

менингитов (ВМ) большинство авторов считают энтеровирусные. Все представители энтеровирусов вызывают менингиты, но наиболее часто — вирусы Коксаки и ЕСНО. Нередко причинами ВМ являются вирусы семейства герпес (простой герпес 1-го, 2-го типа, ветряная оспа, цитомегаловирус, вирус Эпштейна — Барр, вирус герпеса человека 6-го типа), а также парамиксовирусы (эпидемический паротит, парагрипп, респираторно-синцитиальный вирус), арбовирус (менингеальная форма клещевого энцефалита), ареновирус (лимфоцитарный хориоменингит) [5–8].

Традиционно для лабораторной диагностики БМ используют метод культивирования микроорганизмов из образцов ЦСЖ или крови больного. Оставаясь «золотым стандартом» диагностики, этот метод имеет серьезные ограничения, обусловленные применением антибактериальной терапии на догоспитальном этапе. Согласно данным Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии (Россия), в группе больных, получавших антибиотики на догоспитальном этапе, бактерии высевались из ЦСЖ в 30% случаев, а у пациентов, не получивших антибиотики, — как минимум в 60%. Кроме того, бактериологическая диагностика занимает не менее 48 ч [5, 7, 8].

Трудности этиологической расшифровки ВМ связаны со сложностью и длительностью лабораторных исследований. Вирусологический метод является дорогостоящим, трудоемким и в основном применяется в научных целях. Серологическая лабораторная диагностика имеет существенные недостатки: IgM могут циркулировать в крови от нескольких месяцев до нескольких лет, у иммунокомпromетированных пациентов при рецидивах вирусной инфекции антитела к вирусу (как IgM, так и IgG) могут не выявляться [3, 6, 9].

Таким образом, установление этиологической роли конкретного возбудителя при ОМ является непростой задачей и в условиях ограничения стандартных методов диагностики обосновывает необходимость внедрения в клиническую практику новых методов идентификации заболевания [2, 5].

В последние годы определенные перспективы в этиологической диагностике нейроинфекций связывают с развитием молекулярно-генетических технологий детекции нуклеиновых кислот возбудителей инфекционных заболеваний в ликворе, в частности технологии полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая позволяет получить результат через несколько часов от начала исследования, не требует присутствия живых микроорганизмов в исследуемом материале, а только остатков их генетического материала, имеет чувствительность и специфичность, достигающие 100%. ПЦР широко используется для диагностики ОМ в зарубежных странах, но этот метод пока еще не получил значительного распространения в Украине [8, 10].

Целью нашей работы была оценка на клиническом материале диагностической эффективности метода ПЦР для выявления в ЦСЖ *N. meningitidis*, *Str. Pneumoniae*, *H. influenzae* типа *b*, *Enterovirus* (EV), *Herpes simplex 1/2* (HSV-1/2), *Epstein – Barr virus* (EBV), *Cytomegalovirus* (CMV), *Human herpes virus* (HHV-6).

Было исследовано 194 образца ЦСЖ, взятых у больных при госпитализации в клинику кафедры инфекционных болезней ХМАПО с диагнозом ГМ и СМ. Образцы ЦСЖ забирали в объеме 0,5 мл у больных при госпитализации в стационар в рамках обычной диагностической спинномозговой пункции. Для предотвращения ложноположительных результатов использовали одноразовые пункционные иглы и стерильные апиrogenные одноразовые пробирки типа «Эппендорф». Возраст больных колебался в пределах от 18 до 65 лет. Больные были распределены на три группы на основании результатов традиционного (бактериологического, вирусологического и серологического) исследования:

первая группа ($n = 85$) – больные ГМ неустановленной этиологии (культура ЦСЖ и крови – отрицательная);

вторая группа ($n = 100$) – больные СМ неустановленной этиологии (серологические и вирусологические исследования – отрицательные);

третья группа ($n = 9$) – контрольная группа, больные гнойным БМ, у которых культура ЦСЖ была положительной для *Staphylococcus aureus* ($n = 4$), *Staphylococcus saprophyticus* ($n = 1$), *Staphylococcus epidermidis* ($n = 2$), *Neisseria mucosa* ($n = 1$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 1$).

Для проведения ПЦР ДНК-праймеры к генам мишеням S16 рРНК *N. meningitidis*, *Str. pneumoniae* и *H. influenzae* типа *b* были подобраны с использованием программы GeneRunner 3.0 и синтезированы фирмой «Литех» (Россия). При выявлении РНК EV и ДНК герпесвирусов (HSV-1/2, CMV, EBV и HHV-6) методом ПЦР с обратной транскрипцией с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации использовали наборы реагентов «Амплисенс» (Россия).

При исследовании ЦСЖ 85 больных первой группы ПЦР-диагностика была положительной

в 56 случаях: выявлено присутствие ДНК *N. meningitidis* у 38 больных, *Str. pneumoniae* – у 17 и *H. influenzae* типа *b* – у 1 больного.

Из 100 обследованных СМ (вторая группа) методом ПЦР расшифрована этиология менингита у 49 больных: в 26 случаях был диагностирован энтеровирусный менингит, в 23 – герпесвирусный менингит. Этиологическая структура герпесвирусных менингитов была распределена следующим образом: HSV-1/2 – 9 больных, EBV – 4, CMV – 5 и HHV-6 – 5 больных.

Все образцы ЦСЖ больных контрольной группы были отрицательными по методу ПЦР на ДНК *N. meningitidis*, *Str. pneumoniae* и *H. influenzae* типа *b*, HSV-1/2, CMV, EBV, HHV-6 и РНК EV (таблица).

Диагностическая эффективность ПЦР-исследования ЦСЖ больных ОМ

Вирус	Первая группа, $n = 85$, абс. ч. (%)	Вторая группа, $n = 100$, абс. ч. (%)	Третья группа, $n = 9$, абс. ч. (%)
<i>N. meningitidis</i>	38 (22,6)	—	0
<i>Str. pneumoniae</i>	17 (10,1)	—	0
<i>H. influenzae</i>	1 (0,6)	—	0
EV	—	26 (26)	0
HSV-1/2	—	9 (9)	0
EBV	—	4 (4)	0
CMV	—	5 (5)	0
HHV-6	—	5 (5)	0

Исследования ЦСЖ 185 больных ОМ методом ПЦР позволили установить этиологический диагноз в 105 случаях (56,8%). Положительные результаты ПЦР были получены в 56 случаях (30,3%) ГМ и 49 (26,5%) СМ. Важно отметить, что чаще всего ГМ неустановленной этиологии был вызван *N. meningitidis* (67%), а СМ – EV (52%), что имеет как клиническое, так и эпидемиологическое значение.

Таким образом, выявление ДНК и РНК инфекционных агентов с использованием ПЦР является одним из наиболее достоверных методов лабораторной диагностики инфекционных заболеваний. ПЦР позволяет быстро и эффективно обнаружить присутствующий в клиническом образце фрагмент генома возбудителя и обладает определенными преимуществами перед другими методами лабораторной диагностики ГМ и СМ.

Применение ПЦР улучшает диагностику ГМ и СМ, выявляя в ЦСЖ микроорганизмы бактериальной и вирусной этиологии, содержащиеся в единичных количествах или в нежизнеспособном состоянии. Результаты ПЦР-исследований позволяют ставить вопрос о включении данного метода в алгоритм обследования больных с ОМ различной этиологии.

Литература

1. Этиология и лабораторная диагностика гнойных бактериальных менингитов / И. С. Королева, Г. В. Белошицкий, И. Н. Лыткина, Г. Г. Чистякова // Эпидемиология и инфекционные болезни.— 2005.— № 3.— С. 5–9.
2. Королева И. С., Белошицкий Г. В. Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты / Под ред. В. И. Покровского.— М.: Мед. информ. агентство, 2007.— 112 с.
3. Сорокина М. Н., Скрипченко Н. В. Вирусные энцефалиты и менингиты у детей.— М.: Медицина, 2004.— 416 с.
4. Лобзин Ю. В., Пилипенко В. В., Громыко Ю. Н. Менингиты и энцефалиты.— СПб.: Фолиант, 2003.— 128 с.
5. Мікробіологічна діагностика менингококової інфекції та гнійних бактеріальних менингітів: Методичні вказівки, затверджені Наказом МОЗ України № 170 від 15.04.2005 р.— К., 2005.— 42 с.
6. Деконенко Е. П. Заболевания нервной системы, вызываемые вирусами герпеса // Клиническая неврология.— 2007.— № 4.— С. 32–37.
7. Венгеров Ю. Я., Нагибина М. В., Мигманов Т. Э. Актуальные проблемы диагностики и лечения бактериальных менингитов // Лечащий врач.— 2007.— № 9.— С. 31–35.
8. Обзор практических рекомендаций по ведению пациентов с бактериальным менингитом Американского общества инфекционных болезней / И. А. Карпов, А. С. Иванов, И. В. Юркевич и др. // Клиническая микробиология и иммунология.— 2006.— Т. 8, № 3.— С. 217–242.
9. Современные методы иммуно- и генодиагностики в клинической практике / С. В. Сучков, О. В. Москалец, Н. Е. Черепахина и др. // Тер. архив.— 2004.— № 4.— С. 78–83.
10. Carbonnelle E. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis: usefulness of various tests for the determination of the etiological agent // Med. Mal. Infect.— 2009.— Vol. 39, № 7–8.— P. 581–605.

ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ В ДІАГНОСТИЦІ ГОСТРИХ МЕНІНГІТІВ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ТА ВІРУСНОЇ ЕТІОЛОГІЇ

П. В. НАРТОВ

Показано ефективність полімеразної ланцюгової реакції для виявлення в цереброспінальній рідині *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* і *Haemophilus influenzae b*, *Enterovirus*, *Herpes simplex 1/2*, *Epstein – Barr virus*, *Cytomegalovirus*, *Human herpes virus 6* як методу діагностики гострих менингітів, що дозволяє значно підвищити частоту розшифровки етіології гнійних і серозних менингітів.

Ключові слова: полімеразна ланцюгова реакція, цереброспінальна рідина, гнійний менингіт, серозний менингіт.

POLYMERASE CHAIN REACTION IN DIAGNOSIS OF ACUTE MENINGITIS OF BACTERIAL AND VIRAL ORIGIN

P. V. NARTOV

The efficacy of polymerase chain reaction in revealing *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae b*, *Enterovirus*, *Herpes simplex 1/2*, *Epstein – Barr virus*, *Cytomegalovirus*, *Human herpes virus-6* in the cerebrospinal fluid as a method of diagnosis of acute meningitis allowing to increase the frequency of deciphering the etiology of purulent and serous meningitis is shown.

Key words: polymerase chain reaction, cerebrospinal fluid, purulent meningitis, serous meningitis.

Поступила 15.03.2011