

15. Reconstructive Surgery of the Lower Urinary Tract in Children. Ed. by J. W. Thuroff and M. Hohenfellner. ISIS Oxford, 1995. – P.255.
16. Reconstructive Surgery of the Upper Urinary Tract in Children. Ed. by J. W. Thuroff and M. Hohenfellner. ISIS Oxford, 1995. – P.255.
17. Williams D.L. Urology in childhood. – New York., 1974. – 316p.
18. Young B.W. Lower urinary tract obstruction in childhood. – Philadelphia: Lea e Feliger, 1972. – 203p.

СОЧЕТАНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИММУНОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И СОВРЕМЕННОЙ ДНК-ДИАГНОСТИКИ В МОНИТОРИНГЕ ХРОНИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

*С.В.Сучков, Т.В.Иваненко, Е.С.Иевлева, О.В.Москалец,
О.А.Гусева, О.М.Дурова, А.Г.Габибов
МОНИКИ, Институт биоорганической химии АН РФ*

В клинике хронических инфекционных заболеваний двумя важнейшими компонентами в лечении больного являются правильная диагностика вида возбудителя, а также соответствующий параметрический контроль и мониторинг заболевания в целом. С единых позиций врача-клинициста и врача-лаборанта реализуемость указанных факторов обеспечивается комплексом лабораторных технологий, в основе которых лежат современные знания о патогенезе заболевания [3,10].

В литературе достаточно широко и подробно освещены возможности и ограничения целых поколений методов иммунодиагностики и иммунохимического мониторинга заболеваний, в том числе хронических инфекционных процессов [2,5,6,11]. Наряду с использованием индивидуальных стандартизированных технологий, на моделях самых различных хронических инфекций глубоко проанализированы возможности целого ряда комбинаций тех или иных методов и/или их вариантов [2,9], сделаны попытки разработать целостные лабораторно-диагностические панели для мониторинга конкретных нозологических категорий, например, иммуноревмопакет, иммуноонкопакет и другие [1,12,13].

Среди многочисленных методов иммунохимической и серологической диагностики инфекционных заболеваний лидирующее место, несомненно, принадлежит иммуноблотингу, иммуноферментному анализу и непрямой иммунофлюоресценции.

Иммуноблотинг (ИБ) – это высокочувствительный метод, позволяющий идентифицировать инфекционный агент непосредственно в пробе биологического материала от больного с помощью детектирующих иммунных сывороток или моноклональных антител [5]. Недостатком этого метода, однако, является то, что белки находятся в денатурированном состоянии и могут не распознаваться антителами, специфичными по отношению к нативной молекуле. Вместе с тем, при наличии сывороток ко всем составляющим пептидам одновременно выявляется полный антигенный спектр исследуемого белка. ИБ позволяет получать хорошие результаты в диагностической практике, когда требуется идентифицировать того или иного возбудителя в тканях или экскретах больного. К недос-

таткам метода можно отнести трудоемкость и длительность проведения анализа.

Иммуноферментный анализ (ИФА) обладает высокой чувствительностью, он позволяет выявлять нанogramмные количества микробных антигенов. Проведение ИФА в автоматизированном режиме дает возможность осуществлять скрининг больших групп населения. ИФА играет важную роль в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний, именно благодаря этому методу сделан значительный шаг в диагностике целого ряда оппортунистических и перинатальных инфекций. Его возможности измерения титров специфических иммуноглобулинов точны, и поэтому в настоящее время это – наиболее популярный метод серологической диагностики. Он чувствителен и прост в исполнении, может быть использован для выявления серопозитивных образцов как при единичных исследованиях, так и при скрининговом обследовании, что дает возможность быстро подтвердить или отвергнуть диагноз той или иной инфекции. Преимуществом этого метода является также возможная автоматизация постановки и учета реакции, что делает его более объективным. И наконец, высокая чувствительность ИФА позволяет более точно дифференцировать положительные и отрицательные результаты и, таким образом, создаются предпосылки для выработки конкретных диагностических критериев. В то же время по специфичности ИФА несколько уступает непрямой иммунофлюоресценции (НИФ).

Роль ИФА в диагностике инфекционных заболеваний трудно переоценить: практически однозначная оценка характера течения процесса, выявление инаппарантного (бессимптомного) течения приобретенной инфекции у пациента обеспечивает оптимизацию лечебного процесса. В диагностике инфекционных заболеваний ИФА должен использоваться в комплексе с наиболее специфичными тестами, такими, как НИФ, который в настоящее время также широко применяется для выявления инфекционных агентов, в частности в диагностике вирусных и хламидийных инфекций.

Реакция непрямой иммунофлюоресценции основывается на взаимодействии антигена с антителами, конъюгированными с флюоресцирующими красителями (флюорохромами). Метод отличается быстротой постановки (в пределах одного часа), высокой чувствительностью (до 95-97%) и специфичностью (98-99%). К достоинствам НИФ относится возможность ее использования для определения морфологической локализации антигена, к недостаткам – трудность установления каких-либо количественных параметров теста.

Таким образом, в направлении иммунохимической и серологической диагностики инфекционных заболеваний созданы основы единой стратегии и тактики. Эта тактика не проста и требует руководствоваться комплексом не только лабораторных (по нашему мнению, в первую очередь иммунологических), но и клинических данных.

К сожалению, значительно меньше известно о потенциале молекулярно-биологических методов обследования больного с хро-

ническими инфекционными процессами, где в качестве рабочего инструмента, как правило, выступают так называемые ДНК- или РНК-зонды – участки (сегменты) нуклеиновых кислот, полностью повторяющие конфигурацию инфекционного агента. Наиболее часто в практике западных клиник используются ДНК-зонды как прямые индикаторы присутствия чужеродного (бактериального или ДНК-вирусного) материала таких больных [2,4,7,14]. В технологическом плане доминируют, как правило, два основных метода определения чужеродной генетической последовательности: полимеразная цепная реакция (ПЦР) – в 80-90% наблюдений и блотинг – в 10-20%, в основном в практике патогистологов. Сам по себе факт обнаружения в ткани больного чужеродной последовательности ДНК, независимо от используемого методического подхода, помимо чисто фундаментальных аспектов, имеет огромное практическое значение. В отличие от традиционных методов культивирования и высевания микробной массы, требующих значительного времени и далеко не всегда выявляющих первичного возбудителя (например, при низкой плотности инфицирования или замыкании вирусной ДНК в геноме клетки-хозяина с последующим полным "глушением" активности вируса), методы ПЦР-диагностики с абсолютной надежностью и точностью позволяют в течение 1-2 дней безошибочно определить наличие в ткани афферентной ДНК (бактерии или ДНК-содержащего вируса).

ПЦР-диагностика никак не уменьшает значения иммунологических методов и не претендует на роль панацеи. Вместе с тем следует отметить существенные моменты в оценке этого метода:

- высокая специфичность (до 100 %);
- высокая чувствительность (до 95%), позволяющая выявлять не только острые, но и латентные формы заболевания;
- универсальность выделения нуклеиновых кислот для их исследования и, вместе с тем, исключительная информативность относительно структуры индивидуальных регуляторных генов, уровня их экспрессии.

Особую актуальность представляет метод ПЦР для диагностики урогенитальных инфекций, в первую очередь бактериальных, хламидийных, микоплазменных, вирусных и др.

Определенный опыт в плане создания лабораторий клиничко-молекулярно-биологической направленности в результате развития клинической биотехнологии, накоплен во многих западных клиниках, а также в ряде Московских больниц и научно-исследовательских институтов, в том числе в МОНИКИ совместно с Институтом молекулярной генетики и диагностики – на клинических моделях хронических неспецифических заболеваний легких (ХНЗЛ) и урогенитальных инфекций.

Для решения вопросов патогенеза заболеваний, разработки новых эффективных схем лечения, выявления так называемых остаточных явлений заболевания, скрытых форм (серонегативных) инфекций, которые составляют более 20%, ПЦР-диагностику в настоящее время можно рассматривать как наиболее наукоемкую для решения этих проблем.

Очевидно, разумное сочетание ПЦР-диагностики и других лабораторных методов (особенно использование ПЦР в комбинации с ИФА) с клиническими данными позволит решить проблему диагностики инфекционных заболеваний в целом.

В настоящее время врачи-клиницисты все чаще сталкиваются с атипичными вариантами течения хорошо известных заболеваний и с проблемой резистентности к традиционной терапии. Эта ситуация в значительной степени связана с ростом заболеваемости так называемыми "оппортунистическими инфекциями", т.е. болезнями, которые вызываются микроорганизмами, ранее считавшимися непатогенными или условно-патогенными. Эта проблема тесно переплетается с проблемой вторичных иммунодефицитов. Дело в том, что, как правило, оппортунистические инфекции возникают у лиц с нарушенным иммунитетом.

Причины иммунодефицитных состояний весьма разнообразны: сильные стрессы, травмы, операции, несбалансированное питание, радиация и т.д. Учитывая социально-экономическую обстановку, сложившуюся в стране за последние годы, неудивительно, что число лиц с лабораторными и клиническими признаками иммунной недостаточности постоянно растет. В свою очередь, возбудители-оппортунисты еще больше углубляют имеющиеся иммунологические нарушения и, таким образом, возникает порочный круг, вследствие которого клинические проявления болезни могут маскироваться, а элиминации возбудителя, несмотря на проводимую терапию, не наступает. Кроме того, в дальнейшем в патологический процесс вовлекается "банальная" микрофлора, что также приводит к торпидному течению заболевания. Например, нередко женщины безуспешно лечатся у врача-гинеколога от молочницы, а за этим может скрываться хламидиоз или микоплазмоз. Эти же возбудители, а также токсоплазма, вирусы герпеса, цитомегалии, могут быть причиной невынашивания беременности или внутриутробной патологии плода. Не менее одной трети всех случаев пневмонии у пожилых обусловлено хламидиями, микоплазмами, цитомегаловирусом. Таким образом, перед врачом стоит задача своевременной диагностики этих инфекций и мониторинга лечебного процесса.

Чем же следует руководствоваться? Прежде всего, у клинициста должна быть постоянная настороженность относительно оппортунистических инфекций. Как уже упоминалось выше, клиническая картина при этих заболеваниях бывает достаточно скудной. Единственным симптомом респираторного микоплазмоза может быть длительный сухой кашель. При этом физикальное обследование и рентгенография никаких изменений не выявляют. Нередко больным с оппортунистическими инфекциями ставят диагнозы: "субфебрилитет неясного генеза", "хроническая лимфаденопатия", "термоневроз". С другой стороны, на первый план могут выступать внеорганные симптомы. Так, у многих больных урогенитальный хламидиоз манифестирует реактивным артритом, и даже при тщательном расспросе не всегда удается обнаружить признаки пато-

логии половых органов или мочевых путей. Довольно часто развивается астенодепрессивный синдром.

Особо следует остановиться на цитомегаловирусной инфекции, которая может поражать нервную, сердечно-сосудистую, дыхательную, мочеполовую системы, глаза, желудочно-кишечный тракт, костный мозг, щитовидную железу. При его персистенции часто возникают аутоиммунные реакции. Таким больным нередко ставят диагноз "хронический активный гепатит", "аутоиммунный тиреоидит", "тромбоцитопеническая пурпура", "геморрагический васкулит" и длительно лечат кортикостероидами и иммунодепрессивными препаратами, что способствует хронизации процесса. Цитомегаловирус (ЦМВ) может быть одной из причин вялотекущих миокардитов. Цитомегаловирусные пневмонии — одна из причин высокой смертности у больных СПИДом, после трансплантации органов, операций с искусственным кровообращением. С другой стороны, хроническая персистенция возбудителя может проявляться только субфебрилитетом и лимфаденопатией.

Следующий этап в диагностическом процессе — лабораторные методы. Рутинные анализы крови, мочи и других биологических жидкостей, как правило, малоинформативны. Обычно встречаются лимфоцитоз или лимфопения, увеличение количества лейкоцитов в секретах. СОЭ ускорена далеко не всегда. У значительного числа больных эти анализы могут быть в пределах нормы. Более того, при обычном посеве на микробный пейзаж в половине наблюдений микробиолог сталкивается с ситуацией, когда патогенный агент не выявляется.

Как уже отмечалось, для больных с оппортунистическими инфекциями характерны изменения показателей иммунного статуса. Как правило, отмечается повышение одного или нескольких классов сывороточных иммуноглобулинов или дизиммуноглобулинемия. Более выражены эти изменения в секретах. Так, практически у всех больных урогенитальными инфекциями в отделяемом из уретры, влагалища и цервикального канала уровень секреторного IgA повышен. Количество лимфоцитов также возрастает. Почти всегда отмечается дисбаланс показателей клеточного иммунитета, определяемых в периферической крови, который, как правило, выражается в увеличении содержания CD16⁺-клеток при одновременном снижении CD56⁺-клеток. Поскольку маркер CD16⁺ присутствует на мембране как натуральных киллеров, так и моноцитов, а маркер CD56⁺ присутствует в основном на киллерных клетках, можно предположить, что увеличение количества CD16⁺-клеток происходит за счет моноцитов, которые и характеризуют воспалительный процесс. Кроме этого, у таких больных отмечен иммунодефицит за счет угнетения звена Т-хелперов. При этом супрессорное звено, как правило, не задействовано. Поэтому по изменению иммунологических показателей можно лишь предполагать наличие такого рода инфекций. Вместе с тем, эти исследования имеют определенную диагностическую ценность, заключающуюся в возможности контроля за эффективностью лечения и предупреждения рецидива.

Сложность лабораторной диагностики ХНЗЛ и хронических воспалительных урогенитальных заболеваний состоит в том, что многих возбудителей сложно выявлять с помощью обычных микробиологических методов. Центральное место в установлении этиологического фактора принадлежит сочетанию иммунохимических и молекулярно-биологических методов.

Казалось бы, при наличии таких современных методов иммунодиагностики задача врача-клинициста значительно упрощается и сводится к назначению соответствующего обследования, а после получения результатов – к применению стандартных схем лечения. Но здесь возникает новая проблема – интерпретация лабораторных данных. Всегда ли выявление возбудителя означает его этиологическую роль в патологическом процессе? Что такое скрытое носительство? Существует ли разница в тактике ведения серопозитивных и серонегативных больных? Ответить на эти и другие вопросы бывает достаточно сложно.

Схематично инфекционный процесс можно представить следующим образом: попадание возбудителя в организм (и, следовательно, выявление его в органе-мишени) – выработка антител IgM (первичный иммунный ответ) – выработка антител IgG (вторичный иммунный ответ) – снижение уровня IgM и/или элиминация возбудителя – снижение уровня IgG. Следовательно, возможны различные варианты динамики и комбинаций лабораторных показателей, например, выявление возбудителя при отсутствии антител. Это встречается не только на ранних этапах заболевания (антитела еще не выработались), но и при низкой иммуногенности возбудителя (иммунокомпетентные клетки не воспринимают его как "чужое", и иммунный ответ не развивается; этим свойством обладают, например, хламидии), либо вследствие индивидуальных особенностей больного (генетическая рестрикция иммунного ответа).

Если возбудитель обнаруживается в секрете (например, в лаважной жидкости) и одновременно повышены титры специфических антител, то при наличии клинических проявлений его вполне можно рассматривать в качестве этиологического фактора. Если же возбудитель обнаруживается в крови, то не исключено, что это явление вторичное, т.е. под влиянием какого-либо другого микро-организма произошла активация хронической персистирующей инфекции (в этом случае большое диагностическое значение имеют повторные исследования). Наконец, выявление специфических антител без обнаружения возбудителя. Как правило, это наблюдается уже после элиминации возбудителя (анамнестические антитела), причем высокий уровень IgG может держаться в течение нескольких месяцев. Но в ряде случаев это может служить ранним признаком активации хронической инфекции. Поэтому обязательно надо следить за динамикой титров антител.

При носительстве встречаются как серонегативные, так и серопозитивные варианты. Однако в последнем случае обычно не очень сильно повышен уровень IgG. Существенных колебаний титров антител в динамике нет.

Таким образом, использование современных лабораторных методов (особенно молекулярно-биологических), с одной стороны, значительно расширяет диагностические возможности, а с другой, — оно чревато гипердиагностикой. Поэтому их внедрение в повседневную практику должно сопровождаться информацией об их преимуществах и недостатках, общедоступной для широкого круга врачей-клиницистов. И по-прежнему важная роль в лечебно-диагностическом процессе принадлежит врачебной интуиции и опыту.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балабанова Р.М., Егорова О.Н. // Тер. арх. — 1996, №1. — С.78-81.
2. Егоров А.М. // Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева. — 1988, №5. — С.494-501.
3. Иммунология, тт.1-3. Пер. с англ. (под ред. У. Пола). — М.: Мир, 1989.
4. Кнорре Д.Г. // Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева. — 1989, №1. — С.52-60.
5. Chumpitazi B.F., Bossaid A., Pelloux H. et.al. // J. Clin. Microbiol. — 1995, V.33. — P.1479-1485.
6. Hage D.S. // Ann. Chem. — 1995, V.67. — P.455-462.
7. He Q., Vilganen M.K., Mertsola J. et.al. // Mol. Cell. Probes. — 1994, V.8. — P.155-159.
8. Ieven M., Ursi D., Verh K. // Acad. Jeneesk. Belg. — 1994, V.56. — P.593-623.
9. Immunological Techniques // Curr. Opin. Immunol. — 1995, V.7. — P.298-302.
10. Joiner K. // Infect. Agents Dis. — 1994, V.3. — P.163-167.
11. Morgan C.L., Newman D.I., Price C.P. // Clin. Chem. — 1996, V.42. — P.193-209.
12. Mulchine J.L., Scott F. // Chest. — 1995, V.107. — P.280-286.
13. Padha H.S., Wahman J. // Quart. J. Med. — 1995, V.88. — P.233-241.
14. Shober A., Walter N.J., Tanden U. et.al. // Biotechniques. — 1995, V.18. — P.652-661.

ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ ФОРМ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ДЕТЕЙ

*В.Г. Цуман, В.И.Щербина, А.Е.Машков, А.Е.Наливкин,
Н.В.Синенкова, Е.З.Друзюк, Х.Тайем
МОНИКИ*

Гнойно-септические заболевания представляют собой довольно распространенную тяжелую патологию детского возраста. По данным литературы, летальность у детей с тяжелыми формами гнойно-септических заболеваний достигает 23%. При тяжелых формах разлитого гнойного перитонита число неблагоприятных исходов колеблется в пределах 0,7–23% [3,7,14]. При остром гематогенном остеомиелите летальность достигает 11% [1,6], при осложненной острой гнойной деструктивной пневмонии — 17% [1, 9]. Частота хронизации остеомиелитического процесса колеблется от 8 до 30%, а у 11-50% детей с хроническим остеомиелитом возникают различные ортопедические осложнения [1].

Цель исследования — разработка наиболее эффективных методов ранней диагностики и лечения детей с тяжелыми формами гнойно-септических заболеваний для улучшения результатов и со-