

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ В ДИАГНОСТИКЕ МЕНИНГОКОККОВОГО МЕНИНГИТА

Проф. В. П. МАЛЫЙ, Н. В. ВИННИКОВА, канд. мед. наук П. В. НАРТОВ

Харьковская медицинская академия последипломного образования

Показано, что использование полимеразной цепной реакции на ДНК *Neisseria meningitidis* с родowymi и серогрупповыми праймерами у больных гнойными бактериальными менингитами позволяет значительно повысить уровень диагностики менингококкового менингита и является существенным и необходимым дополнением бактериологического метода.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, цереброспинальная жидкость, менингококковая инфекция, менингококковый менингит, серогруппа менингококка.

Заболееваемость менингококковой инфекцией (МИ) в мире по-прежнему определяется в первую очередь эпидемиями в странах «менингитного пояса» в Африке к югу от Сахары, где показатели заболеваемости достигают 100–800 случаев на 100 тыс. населения. В странах Евросоюза и в Украине заболеваемость составляет 1–2 случая на 100 тыс. населения [1, 2]. Уровень заболеваемости МИ прямо коррелирует с крупными катастрофами и авариями. В настоящее время в Украине сложилась тяжелая экономическая и политическая ситуация, сопровождающаяся массовым стрессом, с одной стороны, и приводящая к значительному снижению реактивности людей в плохих бытовых условиях — с другой, что может способствовать высокому риску возникновения МИ.

Основной структурой, определяющей патогенные свойства менингококка, является его полисахаридная капсула — студенистая оболочка, состоящая из высокомолекулярных полисахаридов. Биологическое значение капсулы — защита бактерий от фагоцитоза [3, 4]. Капсульное вещество у разных штаммов неодинаково по своей химической природе и, следовательно, по антигенной специфичности. На основании неоднородности капсул штаммы менингококка делят на 12 серологических групп — А, В, С, X, Y, Z, W-135, 29E, H, I, K и L, из которых только первые три серогруппы (А, В, С) отвечают за более чем 90% случаев клинически выраженной генерализованной МИ в Украине [2].

В мире отмечается варибельность в распространенности серогрупп менингококка в зависимости от времени и географического региона. Так, в Америке основная часть МИ вызвана серогруппами В, С и Y; серогруппа В преобладает в Австралии и Новой Зеландии. В странах Африки серогруппа А составляет 80–85% случаев заболевания МИ, в Азии большинство случаев вызвано серогруппами А и С [5]. Серогруппы В и С в 95% случаев доминируют в странах Европы с преобладанием серогруппы В [6].

Несмотря на то что представители каждой серогруппы могут вызвать инфекционный процесс любой формы и тяжести, в зависимости от групповой принадлежности менингококка имеются некоторые особенности течения заболевания. Так, серогруппа А чаще вызывает менингиты с менингококкемией или без нее, с серогруппами В и С обычно связано развитие менингококкемии с менингитом или без него, перикардита и миокардита. При генерализованной форме МИ, вызванной возбудителями серогруппы В, летальность в 3–5 раз выше, чем при инфекциях, обусловленных возбудителями А или С. Серогруппа С характеризуется относительной резистентностью к пенициллину и способностью вызывать эпидемические вспышки с более тяжелым течением болезни [7].

Наиболее распространенными клиническими проявлениями генерализованной формы МИ у взрослых являются гнойный бактериальный менингит (ГБМ) и ГБМ в сочетании с менингококкемией, гораздо реже встречаются менингококкемия без ГБМ. По данным различных национальных служб эпиднадзора стран СНГ за инфекционной заболеваемостью на территории содружества, около 65% случаев ГБМ были менингококковой этиологии (*Neisseria meningitidis*), 20% — пневмококковой этиологии (*Streptococcus pneumoniae*), 10% случаев были вызваны гемофильной палочкой типа b (*Haemophilus influenzae* типа b или Hib) и 5% — прочими бактериями. Заболеваемость МИ и другими видами ГБМ в Украине достигает 2000 случаев в год при летальности до 14% [2]. Вопросы ранней диагностики генерализованных форм МИ, в частности менингококкового менингита (ММ), чрезвычайно актуальны, поскольку от адекватности лечения зависят течение болезни и ее исход.

Бактериологический метод остается «золотым стандартом» диагностики МИ, но он имеет серьезные ограничения, связанные со сложностью культивирования возбудителя и длительностью исследования (не менее 48 ч), использованием антибиотиков на догоспитальном этапе [8–10].

Бактериологическое подтверждение клинического диагноза МИ в Украине в последние годы составляет от 53 до 57,4% обследованных лабораторно, с колебанием в разных регионах страны от 14,5 до 87%. Бактериоскопическим методом менингококк может быть обнаружен в ликворе и крови, но данные бактериоскопии имеют ориентировочное значение. Использование латекс-агглютинации для обнаружения антигена менингококка в ликворе повышает частоту позитивных результатов до 45–70%, но этот метод характеризуется низкой чувствительностью (60–70%). Определение серогрупповой характеристики менингококков является требованием стандарта ВОЗ. Серогруппирование в настоящее время проводится застарелыми методами, и значительная часть возбудителей остается нетипированной [2].

Наиболее перспективным методом диагностики ММ является полимеразная цепная реакция (ПЦР), которая в отличие от бактериологического метода позволяет получить результат через несколько часов от начала исследования, не требует присутствия живых микроорганизмов в исследуемом материале, имеет чувствительность и специфичность, достигающие 100%. ПЦР широко используется для диагностики ММ в зарубежных странах, но этот метод пока еще не получил значительного распространения в Украине [11–13].

Целью нашей работы является оценка эффективности метода ПЦР для выявления в ликворе *N. meningitidis* и определения ее серогруппы по сравнению с традиционным бактериологическим исследованием.

Нами было исследовано 177 образцов цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), взятой у больных при госпитализации в клинику кафедры инфекционных болезней Харьковской медицинской академии последипломного образования с диагнозом ГБМ. Возраст больных колебался в пределах от 18 до 65 лет. Образцы ЦСЖ забирали в объеме 0,5 мл у больных при госпитализации в стационар в рамках обычной диагностической спинномозго-

вой пункции. Для предотвращения ложноположительных результатов использовали одноразовые пункционные иглы и стерильные апиrogenные одноразовые пробирки типа «Эппендорф». Больные были распределены на три группы на основании бактериологического исследования.

Первая группа (45 пациентов) – больные ММ с бактериологически подтвержденным диагнозом, серогруппа менингококка была определена в реакции агглютинации с культурой в 24 (53%) случаях (серогруппа А – 17 случаев, В – 6 случаев, С – 1 случай). Вторая группа (47 пациентов) – больные ГБМ, вызванным *Str. pneumoniae* (38 пациентов), *Staphylococcus aureus* (4 пациента), *Staphylococcus saprophyticus* (1 пациент), *Staphylococcus epidermidis* (2 пациента), *N. mucosa* (1 пациент), *Klebsiella pneumoniae* (1 пациент). Третья группа (85 пациентов) – больные ГБМ неустановленной этиологии (культура ЦСЖ и крови была отрицательной).

Для выявления *N. meningitidis* были использованы родоспецифические праймеры для гена 16S рибосомальной РНК. Для определения серогруппы менингококков ПЦР проводили с использованием праймеров для генов, участвующих в синтезе капсульных полисахаридов менингококков: для серогруппы А – уникальный ген, кодирующий УДФ-N-ацетил-d-глюкозамин-2-эпимеразу (*myxA*), для серогрупп В и С – гены, кодирующие полисиалилтрансферазу-D (*siaD*) (табл. 1).

Теоретически серогрупповые праймеры способны определить серогруппу менингококка более чем в 90% случаев заболевания, поскольку суммарно менингококки серогрупп А, В и С ответственны более чем за 90% случаев МИ в Украине [2]. Для проверки специфичности и чувствительности серогрупповых праймеров были использованы ДНК 10 штаммов *N. meningitidis* серогруппы В, 2 штамма *N. mucosa* из коллекции Областной СЭС г. Харькова и ДНК 12 штаммов *N. meningitidis* серогрупп А, В, С (7, 4 и 1 штамм соответственно), 15 штаммов других микроорганизмов (6 штаммов *Str. pneumoniae*, 1 штамм *N. mucosa*, 3 штамма *Escherichia coli*, 2 штамма *Klebsiella pneumoniae*,

Таблица 1

Олигонуклеотиды для определения родовой и серогрупповой принадлежности *N. meningitidis*

Возбудитель, серогруппа	Сокращенное название праймера	Последовательность оснований в праймере (5'–3')	Длина ампликона, пар нуклеотидов
<i>Neisseria meningitidis</i>	NM-f	GTGGGGAATTTTGGACAATG	345
	NM-r	ACGCATTTCACTGCTACACG	
Серогруппа А	GA1	GCCAGAGGAAGCAAATAGGCGTT	349
	GA2	GAGCGGAATCACAAAAGAGAATGTTG	
Серогруппа В	GB1	TGGTGGAAAACACTGAAATGATCCA	539
	GB2	TCGATTACTCTCCGCGTGTACCTTG	
Серогруппа С	GC1	CCTGAATATGGTAACAATTAATCCCCGT	209
	GC2	CTTGTTGGGCTGTATGGTGTATCGAATC	

3 штамма *Staphylococcus aureus*), выделенных из ликвора больных ГБН. Эти праймеры были характерны для соответствующей серогруппы во всех 22 образцах штаммов *N. meningitidis* серогрупп А, В, С (100%-ная чувствительность), и не наблюдалось перекрестных реакций между менингококковыми штаммами разных серогрупп или со штаммами других микроорганизмов (100%-ная специфичность).

Оценку эффективности метода ПЦР проводили путем определения чувствительности, специфичности, прогностической ценности положительного результата и прогностической ценности отрицательного результата по сравнению с бактериологическим методом по стандартным формулам.

Чувствительность ПЦР-анализа определяли как процент положительных в ПЦР образцов ликвора, полученных от больных бактериологически подтвержденным ММ, по формуле:

$$\text{чувствительность} = \frac{\text{ИП} \times 100\%}{\text{ИП} + \text{ЛО}}$$

где ИП — истинно-положительный результат; ЛО — ложноотрицательный результат.

Специфичность ПЦР определяли как процент отрицательных в ПЦР образцов ликвора, полученных от больных бактериологически подтвержденным неменингококковым менингитом, по формуле:

$$\text{специфичность} = \frac{\text{ИО} \times 100\%}{\text{ИО} + \text{ЛП}}$$

где ИО — истинно-отрицательный результат; ЛП — ложноположительный результат.

Прогностическую ценность положительного результата (вероятность заболевания при положительном результате ПЦР) определяли как процент образцов ликвора больных бактериологически подтвержденным ММ с положительным результатом ПЦР по формуле:

$$\text{прогностическая ценность положительного результата} = \frac{\text{ИП} \times 100\%}{\text{ИП} + \text{ЛП}}$$

Прогностическую ценность отрицательного результата (вероятность отсутствия заболевания при отрицательном результате ПЦР) определяли как процент образцов ликвора больных бактериологически подтвержденным неменингококковым менингитом с отрицательным результатом ПЦР по формуле:

$$\text{прогностическая ценность отрицательного результата} = \frac{\text{ИО} \times 100\%}{\text{ИО} + \text{ЛО}}$$

При исследовании ЦСЖ 45 больных первой группы, у которых диагноз ММ был подтвержден высевом культуры, ПЦР с родоспецифическими праймерами выявила присутствие ДНК *N. meningitidis* в 44 (98%) случаях. При исследова-

нии ЦСЖ этих больных методом ПЦР с серогрупповыми праймерами серогруппа менингококков была определена в 37 (82%) случаях (серогруппа А — 23 случая, В — 11 случаев, С — 3 случая). ПЦР с серогрупповыми праймерами подтвердила результаты определения серогруппы в реакции агглютинации с культурой и позволила дополнительно расшифровать серогруппу менингококка еще в 14 (31%) случаях.

Все 47 образцов ЦСЖ больных неменингококковым бактериальным менингитом (вторая группа) были отрицательными при исследовании методом ПЦР на ДНК *N. meningitidis*.

Из 85 больных ГБМ с отрицательными данными бактериологического исследования (третья группа) диагноз ММ был подтвержден выявлением менингококковой ДНК в ликворе у 38 больных, в 33 случаях удалось установить серогруппу менингококка методом ПЦР с серогрупповыми праймерами (серогруппа А — 17 случаев, В — 13 случаев, С — 3 случая).

Чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительного результата и прогностическая ценность отрицательного результата метода ПЦР с родоспецифическими праймерами были вычислены с использованием данных табл. 2 по стандартным формулам:

$$\text{чувствительность} = \frac{44 \times 100\%}{44 + 1} = 98\%$$

$$\text{специфичность} = \frac{47 \times 100\%}{47 + 0} = 100\%$$

$$\text{прогностическая ценность положительного результата} = \frac{44 \times 100\%}{44 + 0} = 100\%$$

$$\text{прогностическая ценность отрицательного результата} = \frac{47 \times 100\%}{47 + 1} = 98\%$$

Положительные результаты бактериологического исследования соответствуют первой группе (45 пациентов), отрицательные — второй группе (47 пациентов).

Таблица 2

Данные для вычисления диагностической ценности ПЦР по сравнению с бактериологической диагностикой

ПЦР-результат	Результат бактериологического исследования	
	положительный	отрицательный
Положительный	44 (ИП)	0 (ЛП)
Отрицательный	1 (ЛО)	47 (ИО)

Использование ПЦР с родоспецифическими праймерами в 130 случаях ГБМ (45 больных с бактериологически подтвержденным ММ, 85 — с ГБМ неустановленной этиологии) выявило присутствие ДНК *N. meningitidis* в 82 (63%) образцах ЦСЖ, что дало возможность подтвердить бактериологический диагноз ММ и дополнительно диагностировать еще 38 (29,2%) случаев ММ.

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы.

ПЦР является высокоэффективным методом диагностики ММ и определения серогруппы менингококка благодаря высоким показателям чувст-

вительности (98%), специфичности (100%), прогностической ценности положительного результата (100%) и прогностической ценности отрицательного результата (100%). Данный метод не заменяет традиционные и апробированные микробиологические методики, но является их существенным и необходимым дополнением.

Использование ПЦР у больных ГБМ позволило повысить уровень лабораторного подтверждения диагноза ММ на 29,2% по сравнению с бактериологическим методом.

Применение ПЦР на ДНК *N. meningitidis* серогрупп А, В и С позволяет усовершенствовать диагностику МИ.

Литература

1. Королева И. С., Белошицкий Г. В. Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты / Под ред. В. В. Покровского.— М.: Медицинское информационное агенство, 2007.— 112 с.
2. Мікробіологічна діагностика менингококової інфекції та гнійних бактеріальних менингітів: Методичні вказівки, затверджені наказом МОЗ України від 15.04.2005 р. № 170.— Київ, 2005.— 42 с.
3. Костюкова Н. Н., Бехало В. А. Современные представления о механизмах патогенного действия менингококка // Эпидемиол. и инфекц. болезни.— 2005.— № 5.— С. 40–43.
4. Stephens D. S. Conquering the Meningococcus // FEMS Microbiol. Rev.— 2007— Vol. 31.— P. 3–14.
5. Harrison L. H., Trotter C. L., Ramsay M. E. Global epidemiology of meningococcal disease // Vaccine.— 2009.— Vol. 27, Suppl. 2.— P. B51–B63.
6. Noah N., Henderson B. Surveillance of bacterial meningitis in Europe, 1999/2000.— London, 2002.— 16 p.
7. Мамвеев В. А., Хулун Г. Я. Эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика менингококковой инфекции у детей. Возможности УЗ-исследований при выявлении контингента, особо угрожаемого по развитию молниеносной менингококкемии.— Минск: БелМАПО, 2007.— 48 с.
8. Костюкова Н. Н. Этиологическая структура острых гнойных менингитов и методы их микробиологической диагностики // Клини. лаб. диагностика.— 2001.— № 8.— С. 25–32.
9. Биологическая характеристика основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов / И. В. Власова, Ю. Е. Ершикова, Т. С. Свистунова и др. // Антибиот. и химиотер.— 2002.— Т. 47, № 10.— С. 13–24.
10. Королева И. С., Белошицкий Г. В., Свистунова Т. С. Влияние ранней антибиотикотерапии гнойных менингитов на результативность бактериологической диагностики // Эпидемиол. и инфекц. болезни.— 2002.— № 4.— С. 37–41.
11. Evaluation of a Rapid PCR Assay for Diagnosis of Meningococcal Meningitis / D. C. Richardson, L. Louie, M. Louie, A. E. Simor // J. Clin. Microbiol.— 2003.— Vol. 41 (8)— P. 3851–3853.
12. Bennett D. E., Cafferkey M. T. Consecutive Use of Two Multiplex PCR-Based Assays for Simultaneous Identification and Determination of Capsular Status of Nine Common Neisseria meningitidis Serogroups Associated with Invasive Disease // J. Clin. Microbiol.— 2006.— Vol. 44, № 3.— P. 1127–1131.
13. Polymerase chain reaction for diagnosis and serogrouping of meningococcal disease in children / C. Munoz-Almagro, M. Rodriguez-Plata, S. Marin et al. // Diagnostic Microbiol. and Infect. Dis.— 2009.— Vol. 63, Iss. 2.— P. 148–154.

ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ В ДІАГНОСТИЦІ МЕНІНГОКОКОВОГО МЕНІНГІТУ

В. П. МАЛИЙ, Н. В. ВІННІКОВА, П. В. НАРТОВ

Показано, що використання полімеразної ланцюгової реакції на ДНК *Neisseria meningitidis* з родовими та серогруповими праймерами у хворих на гнійні бактеріальні менингіти дає змогу значно підвищити рівень діагностики менингококового менингіту та є істотним і необхідним доповненням бактеріологічного методу.

Ключові слова: полімеразна ланцюгова реакція, цереброспінальна рідина, менингококова інфекція, менингококовий менингіт, серогрупа менингокока.

POLYMERASE CHAIN REACTION IN DIAGNOSIS OF MENINGOCOCCAL MENINGITIS

V. P. MALIY, N. V. VINNIKOVA, P. V. NARTOV

Application of polymerase chain reaction with the primers for identification and serogrouping *Neisseria meningitidis* in patients with purulent bacterial meningitis allows a considerable increase of the level of meningococcal meningitis diagnosis and is an essential and necessary addition to bacteriological method.

Key words: polymerase chain reaction, cerebrospinal fluid, meningococcal infection, meningococcal meningitis, meningococcal serogroup.

Поступила 22.12.2009
