

симптомных носителей и концентратов воды основная доля образцов характеризуется значительно более низким содержанием ротавирусов со значениями Ct, превышающими 30 циклов. Потенциальная эффективность методов выявления антигенов ротавирусов в данных случаях будет крайне низкой, что не соответствует рекомендуемым областям применения набора.

Конфликты интересов. Авторы публикации – сотрудники ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии», являющегося производителем наборов реагентов торговой марки «Амплисенс», не входивших в перечень сравниваемых диагностикумов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Parashar U.D., Gibson C.J., Bresee J.S., Glass R.I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(2): 304–6.
2. Gautam R.I., Lyde F., Esona M.D., Quaye O., Bowen M.D. Comparison of Premier™ Rotaclone®, ProSpec™, and RIDASCREEN® rotavirus enzyme immunoassay kits for detection of rotavirus antigen in stool specimens. *J. Clin. Virol.* 2013; 58(1): 292–4.
3. Tate J.E., Mijatovic-Rustempasic S., Tam K.I., Lyde F.C., Payne D.C., Szilagyi P. et al. Comparison of 2 assays for diagnosing rotavirus and evaluating vaccine effectiveness in children with gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(8): 1245–52.
4. Podkolzin A.T., Fenske E.B., Abramycheva N.Y., Shipulin G.A., Sagalova O.I., Mazepa V.N. et al. Hospital-based surveillance of rotavirus and other viral agents of diarrhea in children and adults in Russia, 2005–2007. *J. Infect. Dis.* 2009; 200(Suppl. 1): S228–33.
5. Veselova O.A., Podkolzin A.T., Petukhov D.N., Kuleshov K.V., Shipulin G.A. Rotavirus Group A Surveillance and Genotype Distribution in Russian Federation in Seasons 2012–2013. *Int. J. Clin. Med.* 2014; 5: 407–13.
6. Подколзин А.Т., Абрамычева Н.Ю., Фенске Е.Б., Каджаева Э.П., Шипулин Г.А., Сагалова О.И. и др. Сравнение результатов приме-

нения ИФА-тест-систем российского производства для выявления антигенов ротавирусов в фекалиях. В кн.: *Генодиагностика инфекционных болезней. Материалы Российской научно-практической конференции*. Новосибирская область; 2005: 2220–5.

Поступила 01.12.14

REFERENCES

1. Parashar U.D., Gibson C.J., Bresee J.S., Glass R.I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(2): 304–6.
2. Gautam R.I., Lyde F., Esona M.D., Quaye O., Bowen M.D. Comparison of Premier™ Rotaclone®, ProSpec™, and RIDASCREEN® rotavirus enzyme immunoassay kits for detection of rotavirus antigen in stool specimens. *J. Clin. Virol.* 2013; 58(1): 292–4.
3. Tate J.E., Mijatovic-Rustempasic S., Tam K.I., Lyde F.C., Payne D.C., Szilagyi P. et al. Comparison of 2 assays for diagnosing rotavirus and evaluating vaccine effectiveness in children with gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(8): 1245–52.
4. Podkolzin A.T., Fenske E.B., Abramycheva N.Y., Shipulin G.A., Sagalova O.I., Mazepa V.N. et al. Hospital-based surveillance of rotavirus and other viral agents of diarrhea in children and adults in Russia, 2005–2007. *J. Infect. Dis.* 2009; 200(Suppl. 1): S228–33.
5. Veselova O.A., Podkolzin A.T., Petukhov D.N., Kuleshov K.V., Shipulin G.A. Rotavirus Group A Surveillance and Genotype Distribution in Russian Federation in Seasons 2012–2013. *Int. J. Clin. Med.* 2014; 5: 407–13.
6. Podkolzin A.T., Abramycheva N.Y., Fenske E.B., Kadzhaeva E.P., Shipulin G.A., Sagalova O.I. et al. Comparison of the results of the application of ELISA test systems of Russian production of antigen detection of rotavirus in faeces. In: *[Genodiagnostika Infektsionnykh Bolezney: Materialy Rossiyskoy Nauchno-prakticheskoy Konferentsii]*. Novosibirskaya oblast'; 2005: 222–5. (in Russian)

Received 01.12.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.34-002-022.6-078

Подколзин А.Т., Гусева А.Н., Веселова О.А., Курочкина Д.Е., Шипулин Г.А.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНЫХ ДИАРЕЙ В РЕЖИМЕ REAL-TIME

ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, РФ

Цель работы – определение значений параметров, характеризующих концентрации патогенов (пороговый цикл – Ct), коррелирующих с острой фазой вирусных гастроэнтеритов. Обследованы группы пациентов со спорадической и групповой заболеваемостью острыми кишечными инфекциями с применением наборов реагентов Амплисенс (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия) в формате real-time (ОТ) ПЦР на наличие Rotavirus grA, Norovirus GII, Astrovirus, Adenovirus grF, Shigella spp, EIEC, Salmonella spp, Campylobacter spp (термофильная группа). Анализировалось распределение Ct в зависимости от изолированного и сочетанного выявления патогенов в клинических образцах. Проводилась оценка влияния на значения Ct ингибиторов ПЦР, содержащихся в фекалиях, и применения различных амплификаторов: Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX 96 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ДНК технология, Россия). Оценены риски перекрестной контаминации при проведении исследований. Выявлен асимметричный или бимодальный характер распределения значений Ct, связанный со случаями сочетанного выявления нескольких патогенов. Установлены следующие показатели, характерные для пациентов с моноинфекциями (Ct mean±SD): Rotavirus grA (Ct 20,63±6,35; n=978); Norovirus GII (Ct 23,09±6,14; n=794); Astrovirus (Ct 21,06±6,54; n=54); Adenovirus grF (Ct 8,42±2,4; n=42). Соответствующие значения для пострадавших при вспышках составили Norovirus GII (24,19±5,29; n=447), Rotavirus grA (18,65±4,16; n=50). Представлены рекомендации по практической интерпретации результатов real-time PCR. Косвенная характеристика содержания патогенов в образцах клинического материала, получаемая при проведении real-time ПЦР, дает важную информацию об ассоциации патогена с острой фазой заболевания. Высокая информативность данного вида исследований обеспечивает возможность его эффективного применения не только в целях этиологической диагностики, но также при выделении патогена у клинически здоровых людей и решении задач обследования объектов окружающей среды.

Ключевые слова: вирусные гастроэнтериты; ОТ-ПЦР в режиме реального времени. REAL-TIME.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(6): 52–57.

Для корреспонденции: Подколзин Александр Тихонович, apodkolzin@pcr.ru

For correspondence: Podkolzin A.T., apodkolzin@pcr.ru

Podkolozin A.T., Guseva A.N., Veselova O.A., Kurochkina D.E., Shipulin G.A.

THE INTERPRETATION OF RESULTS OF DETECTION OF AGENTS OF VIRAL DIARRHEA IN REAL-TIME MODE

The central research institute of epidemiology of Rospotrebnadzor, 111123 Moscow, Russia

The study was carried out to establish values of parameters characterizing concentrations of pathogens (threshold cycle - Ct) correlating with acute phase of viral gastroenteritis. The groups of patients with sporadic and group morbidity of acute intestinal infections were examined. The reagents kits Amplience (The central research institute of epidemiology, Russia), in real-time format polymerase chain reaction were applied to detect Rotavirus grA, Norovirus GII, Astrovirus, Adenovirus grF, Shigella spp, EIEC, Salmonella spp, Campylobacter spp (thermophilic group). The analysis was applied to distribution of Ct depending on isolated and combined detection of pathogens in clinical samples. The evaluation was implemented concerning effect on Ct values of both inhibitors of polymerase chain reaction contained in feces and application of various amplifiers such as Rotor-Gene Q (QIAGEN, Germany), CFX96 (Bio-Rad, USA), "DT-96" (DNA technology, Russia). The risks of cross contamination during carrying out of investigations are evaluated. The asymmetric or bi-modal character of distribution of Ct values related to cases of combined detection of several pathogens is established. The following indicators are established common for patients with mono-infections (Ct mean±SD): Rotavirus grA (Ct 20.63±6.35; n=978), Norovirus GII Astrovirus (Ct 21.06±6.54; n=54), Adenovirus grF (Ct 8.42±2.4; n=42). The corresponding values for victims of infective episodes amounted to Norovirus GII (24.19±5.29; n=447) and Rotavirus grA (18.65±4.16; n=50). The recommendations are presented concerning practical interpretation of results of real-time polymerase chain reaction. The indirect characteristic of content of pathogens in samples of clinical material derived from real-time polymerase chain reaction provides important information about association of pathogen with acute phase of disease. The high informativeness of given type of investigations support possibility of its effective implementation not only doing etiologic diagnostic but also in case of isolation of pathogen in clinically healthy individuals and examination of objects of environment.

Key words: viral gastroenteritis; real-time polymerase chain reaction;

Citation: *Klinicheskaja Laboratornaia Diagnostika. 2015; 60 (6): 52–57.*

Введение. Активное применение методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) в диагностике вирусных гастроэнтеритов, их высокая аналитическая чувствительность требуют навыков грамотной интерпретации результатов исследований [1, 2]. Под ней подразумевают оценку диагностической ценности теста для решения прикладных задач. Наиболее близкой по смыслу аналитической характеристикой диагностического теста при этом будет позитивное предсказательное значение, т.е. процент истинно позитивных результатов среди положительных результатов, полученных при использовании диагностического теста. Однако разнообразие областей применения наборов реагентов для детекции возбудителей диарейных инфекций требует конкретизации критериев истинной позитивности для каждой из них.

Формат ОТ-ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени (real-time PCR) может успешно использоваться как при обследовании пациентов в острой фазе заболевания, так и при тестировании образцов, характеризующихся низкими концентрациями патогенов (образцы окружающей среды, бессимптомные выделители). Длительные сроки выделения патогенов после перенесенного заболевания могут приводить к необоснованным представлениям о высокой частоте «сочетанного инфицирования» при возникновении на этом фоне заболеваний, вызванных другими возбудителями, или о низкой диагностической значимости тестов в связи с обнаружением возбудителей у клинически здоровых лиц [3–6]. Цель данной работы – определение значений параметров, характеризующих концентрации патогенов (пороговый цикл – Ct), коррелирующих с клиническими проявлениями острой фазы вирусных гастроэнтеритов.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ значений Ct, характеризующих концентрации Rotavirus grA, Norovirus GII, Astrovirus и Adenovirus grF в 3570 образцах фекалий у пациентов со спорадической и групповой заболеваемостью, проходивших комплексное обследование на наличие наиболее распространенных возбудителей острых кишечных инфекций – ОКИ (Rotavirus grA, Norovirus GII, Astrovirus, Adenovirus grF, Shigella spp, EIEC, Salmonella spp, Campylobacter spp (термофильная группа)). Забор материала осуществлялся в первые 72 ч от начала заболевания.

Исследование образцов фекалий проводили с применением наборов реагентов семейства Амплисенс (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, РФ) «РИБО-преп» (№ ФСР 2008/03147) и «ОКИ скрин-FL» (№ ФСР 2008/02265 от 17.10.2014) в соответствии с инструкцией производителя. Если фекалии не

имели водянистой консистенции, для исследования готовилась 10% суспензия фекалий (% объема осадка после центрифугирования) на фосфатном буферном растворе с 20% глицерола.

Диапазон значений Ct, характеризующий острую фазу заболевания, определялся по результатам сопоставления гистограмм его распределения при изолированном и сочетанном с другими возбудителями выявлении патогена.

В качестве максимального значения Ct (соответствующего минимальному значению концентрации патогенов), ассоциированного с острой фазой клинических проявлений заболевания, принимался верхний порог его диапазона с доверительной вероятностью 95% ($p=0,05$).

Учет влияния ингибиторов ПЦР на получаемые значения Ct осуществлялся с использованием данных о результатах тестирования внутреннего контрольного образца (ВКО).

Оценка возможного влияния на получаемые результаты перекрестной контаминации между образцами клинического материала проводилась путем определения доли позитивных результатов тестирования отрицательных контрольных образцов (ОКО), проходивших все этапы исследования, и интерполяции полученных данных на совокупность протестированных образцов клинического материала.

Влияние используемых моделей амплификаторов на различия получаемых значений Ct оценивалось на приборах Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX 96 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ДНК технология, Россия) путем параллельного тестирования панели клинических образцов и определения среднего значения отклонений регистрируемых значений Ct.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета SPSS Statistics 17.0.

Результаты и обсуждение. Результаты тестирования клинических образцов представлены в табл. 1.

Распределение значений Ct при тестировании ВКО, характеризующего влияние потенциальных ингибиторов ПЦР в клинических образцах, представлено на рис. 1.

Распределение носило правильный характер, среднее значение Ct составило $28,87 \pm 1,64$ (среднее значение \pm стандартное отклонение, $n=3570$).

Гистограммы распределения значений Ct, характеризующих концентрации вирусных возбудителей ОКИ в различных группах обследуемых, представлены на рис. 2.

Гистограммы распределения значений Ct, характеризующих концентрации вирусных возбудителей ОКИ у пострадавших в очагах групповой заболеваемости представлены на рис. 3.

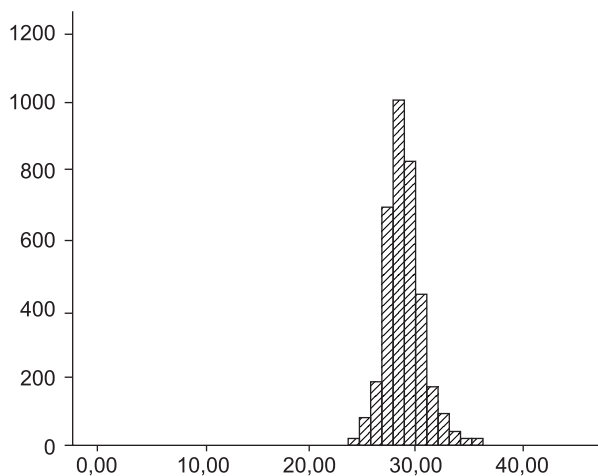


Рис. 1. Гистограмма значений Ct (ДТ-96) ВКО в клинических образцах, характеризующая влияние ингибиторов ПЦР на вариабельность значений Ct, полученных при детекции специфических мишеней патогенов. Здесь и на рис. 2, 3: по оси абсцисс – значение Ct; по оси ординат – количество случаев; $n=3570$).

Характеристики распределения значений Ct, характеризующих концентрации патогенов, представлены в табл. 2.

Оценка возможного влияния на получаемые результаты перекрестной контаминации между образцами клинического материала проводилась путем определения доли позитивных результатов тестирования ОКО, проходивших все этапы исследования, и интерполяции полученных данных на совокупность протестированных образцов клинического материала.

Доля ОКО в общем количестве образцов составила 7,69%. Процент ОКО, давших положительный результат при тестировании, составил для Rotavirus grA 0,37, Norovirus GII 0,13, Astrovirus 0,24 и Adenovirus grF 0,5. Средние значения Ct (среднее значение \pm стандартное отклонение) для данных образцов составили для Rotavirus grA $30,2 \pm 2,4$; Norovirus GII $30,4 \pm 2,88$, Astrovirus $34,3 \pm 1,82$ и для Adenovirus grF $29,0 \pm 3,9$.

Предполагаемое количество ложнопозитивных образцов оценивалось как произведение общего количества протестированных проб клинического материала и частоты (в %) позитивных результатов тестирования ОКО на соответствующий патоген. Их предполагаемая доля от общего количества положительных образцов клинического материала составила

Таблица 1

Результаты тестирования образцов фекалий от пациентов с симптоматикой ОКИ ($n=3570$)

Патоген	Количество образцов без учета случаев сочетанного выявления патогенов, абс. (%)	Количество образцов с сочетанным выявлением патогенов
Rotavirus grA	978 (27,4)	246
Norovirus GII	794 (22,2)	217
Astrovirus	54 (1,5)	61
Adenovirus grF	42 (1,2)	64
Shigella spp/EIEC	76 (2,1)	38
Campylobacter spp	63 (1,8)	62
Salmonella spp +EIEC	41 (1,1)	26
Неуточненная этиология	1161 (32,5)	-
Сочетания патогенов	361 (10,1)	-

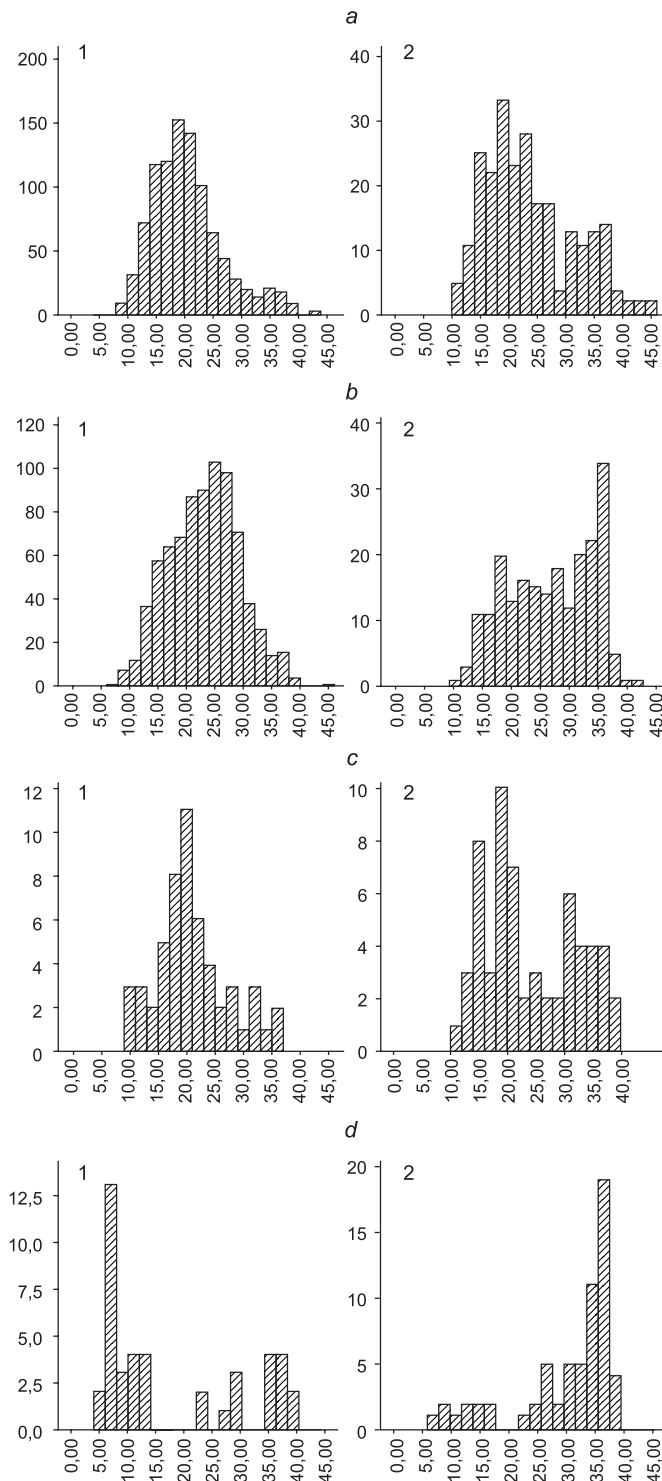


Рис. 2. Гистограмма значений Ct (ДТ-96) при детекции Rotavirus grA (a); Norovirus GII (b); Astrovirus (c) и Adenovirus grF (d) в группах пациентов с исключением случаев сочетанного выявления нескольких патогенов (1), в случае сочетанного выявления патогенов (2).

A1 – $n = 978$, A2 – $n = 246$, B1 – $n = 794$, B2 – $n = 217$, C1 – $n = 54$, C2 – $n = 61$, D1 – $n = 42$, D2 – $n = 64$.

для Rotavirus grA 2,5%, Norovirus GII 2,0%, Astrovirus 5,0% и Adenovirus grF 14,0%.

Следует отметить, что реально возможная доля ложнопозитивных образцов в исследовании была многократно ниже в связи с обязательным повторным тестированием образцов

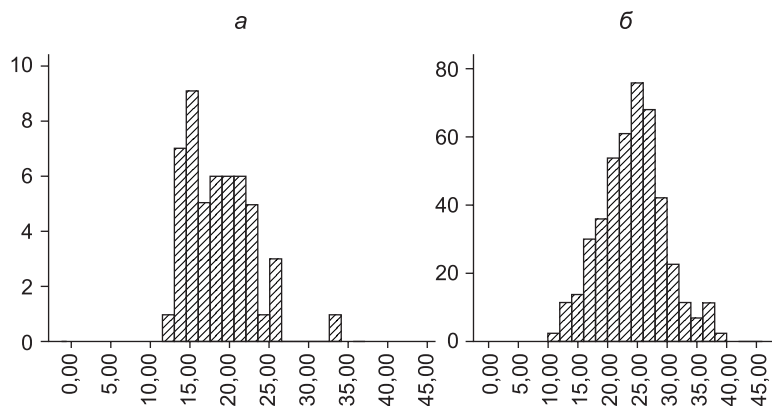


Рис. 3. Гистограмма значений Ct (ДТ-96) при детекции Rotavirus grA (а, n = 50), Norovirus GII (б, n = 447) в группах пациентов из очагов групповой заболеваемости с исключением случаев сочетанного выявления нескольких патогенов.

с Ct >28 вне зависимости от наличия в панели образцов с высокой вирусной нагрузкой.

Результаты оценки влияния используемых моделей амплификаторов на различия получаемых значений Ct представлены в табл. 3.

Уникальной особенностью наборов реагентов на основе real-time PCR, применяемых для детекции возбудителей вирусных гастроэнтеритов, является разнообразие потенциальных областей их применения, в которые входит как этиологическая диагностика синдрома острой диареи, так и обследование контактных лиц, а также исследование образцов окружающей среды с целью выявления потенциальных факторов передачи патогенов. Разнообразие исследуемого материала требует дифференцированного подхода к интерпретации получаемых результатов исследования.

Нестандартизованность такого типа клинического материала, как фекалии, делает невозможной количественную, в строгом смысле данного термина, характеристику содержания в них патогенов. На практике анализ значений Ct, характеризующий концентрацию патогенов, несмотря на возможную погрешность измерений, оказывается информативным подходом для оценки его соответствия острой фазе диарейного заболевания.

Факторы, связанные с нарушением рекомендуемых методов забора материала, режимов, сроков его хранения, транспортировки, в данной работе не рассматриваются.

Потенциальные ошибки в оценке концентраций патогенов в образцах фекалий могут быть связаны с такими факторами, как различия в их консистенции, степени разведения при приготовлении суспензии для тестирования и влиянии ингибиторов ПЦР, уникальных для каждого исследуемого образца. Если степень разведения клинического образца является контролируемым и маловариабельным параметром (приготовление 10% суспензии фекалий оформленной консистенции и исследование неразведенных образцов при водянистой консистенции соответствует 1 lg вариабельности концентраций патогенов), то потенциальное влияние ингибиторов ПЦР требует отдельной оценки.

Вариабельность значений Ct ВКО, используемого с этапа экстракции нуклеиновых кислот, характеризовалась стандартным отклонением ± 1,64 Ct, что позволяло оценивать влияние потенциальных ингибиторов ПЦР как параметр, подверженный малой вариабельности и способный смещать регистрируемые значения Ct при детекции патогенов в аналогичном диапазоне.

При неудовлетворительной организации работы лаборатории появление значительного количества образцов с низкой концентрацией патогенов может свидетельствовать о наличии проблемы ложноположительных результатов исследования.

Если проблема возможной контаминации продуктами амплификации выявляется и решается путем проведения организационно-профилактических мероприятий, то влияние перекрестной контаминации между исследуемыми образцами требует обязательной отдельной оценки. Исходя из данных расчета потенциально возможного количества ложноположительных результатов исследования, возникающих вследствие перекрестной контаминации между исследуемыми образцами, можно сделать два вывода: потенциальное влияние данного фактора на полученные в работе данные по характеристике распределения Ct незначительно; максимальные риски перекрестной контаминации возникают при работе с патогенами, характеризующимися максимальными среднелинческими концентрациями патогенов (прежде всего Adenovirus 40/41 типа).

Представленные данные подтверждают актуальность рекомендаций по раздельному проведению работ с материалом от пациентов, находящихся в острой фазе заболевания, и образцами, характеризующимися низкими концентрациями патогенов.

Различия в концентрации патогенов в образцах фекалий могут быть связаны с такими разнообразными причинами, как инфицирование различными субтипами патогенов, особенностями течения заболевания у лиц разного возраста, состояние популяционного иммунитета и др. Наиболее вероятными факторами, имеющими максимальное прикладное значение, являются сроки заболевания, на которых проводится обследование пациентов.

Данные о длительности выделения вирусов после перенесенного заболевания достаточно разнообразны, но, как правило, охватывают диапазон от 2 нед до 1 мес [3–6]. При развитии в данный период кишечной инфекции другой этиологии лабораторные исследования выявляют сочетание патогенов, в котором ассоциация с клинической картиной заболевания имеет только один из них. В этих случаях для правильной интерпретации значимости диагностической находки важна оценка ее соответствия среднелинческим концентрациям конкретного возбудителя.

В условиях рутинной работы лабораторий медицинских учреждений далеко не все пациенты проходят комплексное обследование на наличие широкого спектра потенциальных возбудителей ОКИ. При первичной этиологической диаг-

Таблица 2

Диапазоны Ct, характеризующие среднелинческие концентрации патогена

Патоген	Все случаи*	Вспышки**
Rotavirus grA	20,63 ± 6,35; n = 978**	18,65 ± 4,16; n = 50
Norovirus GII	23,09 ± 6,14; n = 794	24,19 ± 5,29; n = 447
Astrovirus	21,06 ± 6,54; n = 54	-
Adenovirus grF	8,42 ± 2,4***; n = 42	-

Примечание. * – среднее значение ± стандартное отклонение (mean ± SD) для набора реагентов Амплисенс ОКИ-скрин (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии) и прибора ДТ-96 (ДНК-технология); ** – указано количество образцов без учета случаев сочетанного выявления патогенов; *** – характеристики распределения для первого пика гистограммы.

Таблица 3

Различия в значениях Ct на приборах Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX 96, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ДНК-технология, Россия). Среднее значение ± стандартное отклонение (p = 0,05; n = 16)

Каналы детекции	«ДТ-96»	Rotor-Gene Q	CFX 96	iCycler iQ5
Fam	0	+1,46 ± 0,29	+2,98 ± 0,44	-3,08 ± 0,34
Hex	0	-1,34 ± 0,46	+1,1 ± 0,60	-1,23 ± 0,93

ностике значительная их часть обследуется на наличие отдельных патогенов, и решение о достаточности проведенных исследований или необходимости дальнейшего диагностического поиска определяется грамотной интерпретацией значимости положительных находок.

При проведении повторных исследований, особенно у пациентов с тяжелым, затяжным или волнообразным течением заболевания, ответственность, связанная с возможной гиподиагностикой сопутствующего инфицирования другими патогенами, значительно возрастает. Сомнения в необходимости повторной расширенной этиологической диагностики кишечных инфекций в этих случаях должны решаться в пользу ее проведения [7, 8].

Идеальным форматом работ по верификации среднелинеческих концентраций патогенов является динамическое наблюдение за пациентами с дебюта заболевания до окончания выделения патогена. Исследования такого рода очень ценны, но их организация крайне трудоемка, особенно при необходимости получения больших массивов информации.

В силу данных причин избран альтернативный вариант оценки концентраций патогенов, ассоциированных с острой фазой заболеваний, в периоде его манифестации при сопоставлении случаев изолированного и сочетанного выявления возбудителей.

Достоверность понятия «моноинфекция» определяется спектром диагностических исследований и будет возрастать по мере увеличения количества искомых патогенов. Исходя из этого, нельзя рассматривать регистрацию моноинфекции как абсолютное доказательство доминирующей роли патогена в формировании клинических проявлений заболевания, поскольку часть из этих случаев будет представлять недиагностированную микстинфекцию с патогенами, не включенными в диагностический скрининг.

Исходя из того, что доля ОКИ установленной этиологии превышает долю ОКИ неустановленной этиологии (67,5–32,5%) и доля выявленных моноинфекций превышает долю выявленных микстинфекций (57,4–10,1%), можно утверждать, что вклад случаев с доминирующей ролью патогена в группе зарегистрированных моноинфекций выше, чем в группе микстинфекций с его участием.

Выявленные различия в гистограммах распределения значений St между разными группами будут отражать характеристики случаев доминирующей роли конкретного патогена.

При анализе гистограмм распределения значений St в группах пациентов с сочетанным выявлением патогенов отмечается бимодальный либо отрицательно асимметричный тип распределения значений в сравнении с группами моноинфекций. При этом наиболее выраженное бимодальное распределение отмечается при кишечной аденовирусной инфекции с полным выпадением значений в медианной области. При норовирусной инфекции отмечается правосторонняя отрицательная асимметрия распределения. В случаях ротавирусной и астровирусной инфекций гистограммы носят промежуточный характер. Возможным объяснением этого является расположение пиков гистограмм, характеризующих предполагаемые случаи «истинных моноинфекций». При аденовирусной инфекции пик наиболее ранний, что позволяет хорошо визуализировать бимодальный характер распределения в отличие от норовирусной инфекции с наиболее поздним, смещенным вправо пиком.

Превалирование низких значений St в случаях моноинфекций позволяет характеризовать эти значения как ассоциированные с доминирующей ролью патогена.

Максимально выраженная бимодальность распределения значений St при аденовирусной инфекции с отсутствием значений в центральной зоне гистограммы позволяет четко охарактеризовать распределение значений в первом пике, характеризующем доминирующую роль патогена, – $8,42 \pm 2,4$ ($n=42$).

В случаях ротавирусной и астровирусной моноинфекций наряду с ранним пиком можно отметить редуцированный второй пик, что может подтверждать предположение о нали-

чии в данной группе недиагностированных микстинфекций с второстепенной ролью выявленных патогенов.

Несколько более точные данные о значениях St, характеризующих острую фазу заболевания, можно получить анализируя образцы из очагов групповой заболеваемости, в которых манифестация заболевания имеет не только лабораторное подтверждение этиологии, но и временную привязку к групповому эпизоду инфицирования. Оценить характеристики распределения St в данных группах представлялось возможным только в отношении норовирусной ($24,19 \pm 5,29$; $n=447$) и ротавирусной ($18,65 \pm 4,16$; $n=50$) инфекций. Оба распределения характеризовались меньшей вариабельностью и, вероятно, более точно отражали истинный характер распределения величин St, ассоциированных с острой фазой заболевания. Можно констатировать, что в качестве максимальных значений St, которые могут быть ассоциированы с острой фазой заболевания, можно рекомендовать следующие величины (ДТ – 96, mean + 2SD; $p=0,05$): для ротавирусной инфекции 27, норовирусной – 35, астровирусной – 34 и аденовирусной – 13 (с учетом отсутствия значений в медианной области значение может быть увеличено до 20).

В инструкции производителя представлены сведения о максимальных (граничных) значениях St, при превышении которых результаты исследования не может считаться положительным в связи с техническими сложностями интерпретации формы кривой накопления сигнала. Данные значения St не должны рассматриваться в качестве характеристики клинических концентраций патогенов.

Использование различных моделей амплификаторов приводит к изменению средних значений St до трех циклов, что необходимо учитывать при использовании различного оборудования (см. табл.).

Выводы. 1. Real-time PCR – информативный метод, позволяющий дифференцированно оценить информативность исследования при различных областях его применения.

2. При практической интерпретации результатов исследований в области клинической диагностики необходима оценка соответствия выявленных значений St среднелинеческим концентрациям патогенов. При выявлении несоответствия должен проводиться анализ его причин и решаться вопрос о расширении спектра диагностических исследований.

3. При интерпретации результатов исследований материала от клинически здоровых лиц и объектов окружающей среды должны интерпретироваться все значения St, не превышающие граничных значений, установленных производителем.

Конфликты интересов. Авторы публикации – сотрудники ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии», являющегося производителем наборов реагентов торговой марки «Амплиценс».

ЛИТЕРАТУРА

1. Подколзин А.Т., Веселова О.А., Яковенко М.Л., Коновалова Т.А., Петухов Д.Н., Яцьшина С.Б. и др. Анализ структуры летальных исходов у детей младшего возраста при острых кишечных инфекциях. *Инфекционные болезни*. 2013; 11(2): 38–44.
2. Линвинчук О.А., Коновалова Т.А., Подколзин А.Т., Горелов А.В., Шипулин Г.А. Нозокомиальные кишечные инфекции в инфекционных отделениях детских стационаров. В кн.: *Покровский В.И., ред. Молекулярная диагностика*. 2010. М.; 2010: 413–5.

Поступила 01.12.14

REFERENCES

1. Corcoran M.S., van Well G.T., van Loo I.H. Diagnosis of viral gastroenteritis in children: interpretation of real-time PCR results and relation to clinical symptoms. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 33(10): 1663–73.
2. Elfving K.I., Andersson M., Msellem M.I., Welinder-Olsson C., Petzold M., Björkman A. et al. Real-time PCR threshold cycle cutoffs help to identify agents causing acute childhood diarrhea in Zanzibar. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(3): 916–23.
3. Partridge D.G., Evans C.M., Raza M., Kudesia G., Parsons H.K. Lessons from a large norovirus outbreak: impact of viral load, patient age and ward design on duration of symptoms and shedding and likelihood of transmission. *J. Hosp. Infect.* 2012; 81(1): 25–30.

4. Rishardson S., Grimwood K., Gorrell R., Palombo E., Barnes G., Bishop R. Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children. *Lancet*. 1998; 351(9119): 1844–8.
5. Musher D.M., Musher B.L. Contagious acute gastrointestinal infections. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351(23): 2417–27.
6. Akihara S., Phan T.G., Nguyen T.A., Hansman G., Okitsu S., Ushijima H. Existence of multiple outbreaks of viral gastroenteritis among infants in a day care center in Japan. *Arch. Virol.* 2005; 150(10): 2061–75.
7. Podkolzin A.T., Veselova O.A., Jakovenko M.L., Konovalova T.A., Petukhov D.N., Jacyshina S.B., Vorob'eva N.S., Shipulin G.A. The analysis of structure of lethal outcomes in young children suffering from acute diarrheal infections. *Infectious diseases*. 2013; 11(2): 38–44. (in Russian)
8. Litvinchuk O.A., Konovalova T.A., Podkolzin A.T., Gorelov A.V., Shipulin G.A. Nosocomial infection in intestinal infectious departments of children's hospitals. In: *Molecular Diagnostics. V.I. Pokrovsky, ed.*, 2010. (in Russian)

Received 01.12.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 612.3.086

Самоукина А. М.¹, Михайлова Е. С.¹, Червинец В. М.¹, Миронов А. Ю.², Алексеева Ю. А.¹

МИКРОЭКОЛОГИЯ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА

¹ГБОУ ВПО «Тверская ГМА» Минздрава России, 170100, г. Тверь; ²ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, г. Москва

Изучены качественные и количественные параметры ротовой жидкости и кала у 74 практически здоровых людей различных возрастных групп. В большинстве случаев выявлены изменения микроэкологии, характеризующиеся уменьшением количества индигенной микрофлоры и увеличением численности условно-патогенных микроорганизмов родов Staphylococcus, Bacillus, Candida, степень выраженности этих изменений достоверно увеличивается с возрастом. Установлено, что микробиота начальный и конечный биотопы пищеварительного тракта тесно взаимосвязаны между собой и имеют ряд общих особенностей, зависящих от возраста, гормонального и иммунного статуса и отражают состояние микробиоценоза пищеварительного тракта в целом. Характер и степень выраженности изменений микробиоценоза могут быть эффективным диагностическим критерием для комплексной оценки состояния здоровья человека с последующим формированием групп риска, нуждающихся в определенном объеме коррекционных мероприятий.

Ключевые слова: микробиоценоз; полость рта; кишечник; пищеварительный тракт; здоровые люди.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(6): 57–60.

Samoukina A.M.1, Mikhailova E.S.1, Chervinets V.M.1, Mironov A.Yu.2, Alekseeva Yu.A.1

THE MICRO-ECOLOGY OF DIGESTIVE TRACT AS AN INDICATOR OF HUMAN HEALTH CONDITIONS

¹The Tverskaia state medical academy of Minzdrav of Russia, 170100 Tver, Russia; ²The G.N. Gabritchevskii Moscow research institute of epidemiology and microbiology of Rosпотребнадзор, 125212 Moscow, Russia

The study was carried out to analyze qualitative and quantitative parameters of oral fluid and feces in 74 healthy individuals of different age groups. In most of the cases, alterations of micro-ecology are established characterizing by decreasing of amount of indigenous micro-flora and increasing of number of opportunistic pathogenic microorganisms of genera of Staphylococcus, Bacillus, Candida. The degree of evidence of these alterations reliably increases with age. It is established that microbiota, initial and terminal biotopes of digestive tract are closely interrelated and have number of common characteristics depending on age, hormonal and immune status and reflect conditions of micro-biocenosis of digestive tract in general. The character and degree of evidence of alterations of micro-biocenosis can be an effective diagnostic criterion for complex evaluation of human health conditions with following formation of risk groups in need of particular volume of correction activities.

Key words: micro-biocenosis; oral cavity; intestine; digestive tract; health individuals

Citation: Klinicheskaja Laboratornaia Diagnostika. 2015; 60 (6): 57–60.

Введение. Дисбиотические изменения в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) связаны с различными заболеваниями органов и систем и сами могут приводить к возникновению патологических изменений во всех отделах пищеварительного тракта от ротовой полости до кишечника. Микробное сообщество различных биотопов пищеварительного тракта характеризуется сложной системой взаимосвязей и быстро реагирует на воздействие внешних и внутренних факторов видовыми и количественными изменениями даже при отсутствии клинических симптомов и жалоб [1–7].

Формирование здорового поколения является приоритетной задачей современного здравоохранения. Концепция развития здравоохранения РФ до 2020 г. рассматривает обязательства по охране здоровья подрастающего поколения как

инвестиции в главный ресурс общественного развития. Составление микрофлоры пищеварительного тракта может быть одним из интегральных критериев оценки состояния здоровья человека, а изменения численности микроорганизмов или их индикаторных свойств могут рассматриваться как показатели индивидуального адаптогенеза [8–12].

Выявление наиболее часто встречающихся изменений микроэкологии в различных биотопах пищеварительного тракта, их взаимосвязь и выбор более доступного для исследования биоматериала у здоровых людей имеют важное практическое значение при проведении диспансеризации [9, 10, 13, 14].

Для детального изучения микрофлоры ЖКТ проводятся сложные микробиологические исследования, которые занимают достаточно продолжительное время, являются трудоемкими, экономически затратными. Наиболее распространенным методом оценки микробиоты пищеварительного тракта является бактериологическое исследование кала, тогда как микроэкология полости рта, являющаяся начальным отделом пищеварительного тракта и доступная для забора биоматериала

Для корреспонденции: Самоукина Анна Михайловна, anna_samoukina@mail.ru

For correspondence: Samoukina A.M., anna_samoukina@mail.ru