

© Романенко Т.А., Біломеря Т.А., Козловська Р.О., 2010
УДК 616.912.8-07:547.963.32

Т.А. Романенко, Т.А. Біломеря, Р.О. Козловська
**ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ
ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ КАШЛЮКУ**

Донецький національний медичний університет ім. М. Горького, обласна санітарно-епідеміологічна станція

Вперше в Україні узагальнено досвід використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для лабораторного підтвердження кашлюкової інфекції в Донецькому регіоні за 2007-2009 рр. Частота виділення ДНК збудника кашлюку в ПЛР серед обстежених осіб різного віку корелювала з рівнем захворюваності на кашлюк. Показана доцільність широкого впровадження ПЛР для ранньої діагностики кашлюку як інформативного і об'єктивного методу ідентифікації збуднику.

Ключові слова: кашлюк, діагностика, полімеразна ланцюгова реакція, вікові групи, захворюваність.

Незважаючи на багаторічне проведення загальної планової вакцинопрофілактики кашлюку, в перебігу його епідемічного процесу ще не відбулися зрушення, характерні для вакцинокерованих інфекцій: не вдалося досягти спорадичного рівня захворюваності та подовження міжепідемічних інтервалів, майже не змінився віковий розподіл захворюваності. Так, в Україні з 2003 р. відбувається активізація епідемічного процесу кашлюку: показник захворюваності підвищився з 1,63 на 100 тис. населення до 5,22 на 100 тис. у 2006 р., тобто в 3,2 разу. Найбільш ураженою віковою групою залишаються діти перших років життя. У 2006 р. показник захворюваності дітей віком до 2 років досяг 106,9 на 100 тис. осіб даного віку та був найвищим за період з 1992 р. [1].

Однією з можливих причин такої ситуації є недосконалість діагностики кашлюку, наслідком чого є неповне виявлення і реєстрація захворювання в осіб більш старшого віку, а звідси – неправильні висновки про епідемічну ситуацію, некоректний епідеміологічний діагноз та зниження ефективності заходів боротьби з цією інфекцією. Зміни рівня захворюваності у групі дітей наймолодшого віку дають найбільш об'єктивну інформацію про тенденції епідемічного процесу кашлюку, вона є індикаторною для епідеміологічної діагностики кашлюку, адже діти наймолодшого віку мають яс-

раво виражені специфічні клінічні ознаки хвороби, отже захворюваність серед них діагностується і реєструється у повному обсязі.

Виявлення та рання діагностика випадків хвороби серед осіб будь-якого віку в початковій, катаральній стадії, коли хворий найбільш небезпечний в епідеміологічному плані, має велике значення не тільки у ліквідації осередків кашлюкової інфекції, а й взагалі для зниження захворюваності на кашлюк [2]. Ці заходи можуть допомогти нещепленим особам запобігти інфікуванню в оточенні хворого на кашлюк, а лікування антибіотиками на ранній стадії інфекції знижує тяжкість, веде до швидкого припинення виділення бактерій, тим самим скорочує період можливої передачі інфекції.

Типовими ознаками кашлюку у дітей є спазматичний кашель, напади судомного кашлю, які тривають декілька тижнів. Однак, у разі інфікування раніше вакцинованих осіб можуть виникати нетипові, стерті форми кашлюку, без класичних клінічних стадій хвороби. Утруднює своєчасну діагностику кашлюку наявність вираженого кашлюкоподібного синдрому при багатьох соматичних захворюваннях, можливість частого виникнення мікст-інфекції.

Лабораторна діагностика, що застосовується для виявлення кашлюкової інфекції, недостатньо ефективна [3, 4]. Абсолютним підтвердженням етіологічної природи хвороби є виявлення збуднику кашлюку з допомогою прямих методів ідентифікації *Bordetella pertussis* у зразках матеріалу, відібраного у хворого в катаральному періоді захворювання. З ряду причин (запізні строки обстеження, неправильний добір матеріалу від хворих, недотримання умов транспортування і зберігання, використані поживні середовища та інші) частота позитивних бактеріологічних знахідок кашлюку становить 6-15 % [5].

Використання непрямих серологічних досліджень зазвичай виявляє аглютинуючі антитіла

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

(реакція аглютинації, РНГА), однак їх синтез більш активно відбувається в процесі імунізації, а не хвороби. Серопозитивну відповідь можна отримати в досить пізні терміни від початку захворювання і не більше, ніж у 20-32 % хворих [6].

Рутинні методи діагностики кашлюку (бактеріологічний, серологічний) не відповідають вимогам сучасності, займають тривалий час, мають обмежену результативність, пов'язані з матеріальними витратами. Тому на сучасному етапі необхідно розробляти і впроваджувати нові методи лабораторної діагностики кашлюку з кращими показниками специфічності та інформативності, зокрема – полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). Перевагами ПЛР порівняно з методами досліджень, що застосовуються для клініко-лабораторної діагностики, є висока специфічність і чутливість методу, швидкість проведення аналізу (декілька годин), простота методики, відсутність перехресних реакцій з гетерологічними штамами, а також можливість діагностики кашлюку у ранні стадії хвороби.

Нами була вивчена можливість застосування методу ПЛР, що передбачає виявлення ДНК збудника *B. pertussis*, для діагностики кашлюкової інфекції.

Матеріали і методи

За матеріалами карт епідеміологічного обстеження осередку (форма 357/о) та статистичних звітів (форми 1/о, 2/о) санітарно-епідеміологічних станцій Донецької області і м. Донецька методом епідеміологічного аналізу було визначено особливості перебігу епідемічного процесу кашлюку, а також стан лабораторного підтвердження інфекції з діагностичною метою та в епідемічних осередках за 2007-2009 рр.

Проведено і узагальнено результати обстеження на кашлюк методом ПЛР 283 осіб з підозрою на це захворювання. Дослідження виконано в лабораторії ТОВ «Надія». Для постановки ПЛР з метою лабораторного підтвердження кашлюку застосовували набір реагентів (тест-систему) для виявлення ДНК *B. pertussis* методом ПЛР, виробництва науково-виробничої фірми «ДНК-Технологія» (Москва). Набір складається з трьох комплектів: комплект для виділення ДНК із клінічного матеріалу, комплект для проведення ПЛР зі специфічними для ДНК *B. pertussis* праймерами, комплект для детекції продуктів ПЛР. Дослідження в ПЛР дає можливість швидкого виявлення послідовностей ДНК *B. pertussis* в біологічних зразках (назофарингеальний мазок, бронхоальвеолярний лаваж та ін.). Метод базується на ампліфікації ДНК збудника кашлюку за допомогою ферменту термостабільної ДНК-полімерази із 4 дезоксинукле-

озидтрифосфатів, що є структурними елементами ДНК, та специфічних для ДНК *B. pertussis* праймерів. Тест-система зарекомендувала себе як високочутлива і достатньо специфічна для виявлення хворих на кашлюкову інфекцію при використанні у практиці охорони здоров'я [5].

Статистичні обчислення проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики [7].

Результати досліджень та їх обговорення

Всього за 2007-2009 рр. методом ПЛР для виявлення ДНК *B. pertussis* обстежено 283 особи, в тому числі діти віком до 1 року становили 7,1 % обстежених, 1 року – 9,5 % (табл. 1).

Частка немовлят першого року життя серед обстежених у ПЛР для підтвердження випадків кашлюку була нижчою порівняно з дітьми іншого віку, можливо тому, що діти наймолодшого віку мають яскраво виражені клінічні прояви кашлюкової інфекції і не потребують лабораторного обстеження для встановлення діагнозу кашлюку.

Найбільшу частку складала діти 2-3 років – 31,1 %. На другому місці за частотою обстежень були діти 4-5 років – 23,3 % у віковій структурі обстежених. За ними слідує діти 6-7 років – 14,8 %, а в 2007 р. їх частка складала 19,4 %. Рідше за представників інших вікових груп за обстеженням звертались особи більш старшого віку: школярі 8-10 років – у середньому становили 6 % обстежених (у 2009 р. їх частка досягала 14,6 %), школярі 11-14 р. – 2,8 % обстежених, підлітки 15-19 р. – 3,2 %, дорослі – 2,1 % обстежених. Тобто, найчастіше потребують обстеження з метою уточнення діагнозу «кашлюк» діти віком 2-3 і 4-5 років.

У 2007 р. було обстежено більше осіб, ніж в інші роки. Частота позитивних результатів була вищою, ніж в 2008 р., що корелювало зі зниженням рівня захворюваності на кашлюк у 2008 р. як у місті, так і в області (інтенсивний показник у м. Донецьку в 2007 р. становив 5,6 на 100 тис. нас., у 2008 р. – 1,3 на 100 тис. нас.). То ж результати ПЛР підтверджують широку циркуляцію кашлюкового мікробу в популяції.

Однак серед осіб різного віку збудник кашлюку ідентифікувався нерівномірно. Найчастіше позитивні знахідки було отримано серед дітей віком 1 рік – у 46,2 % обстежених цього віку. Наступними групами за частотою виділення відповідних кашлюку послідовностей нуклеїнових кислот були школярі молодших класів. У 32,1 % дітей 6-7 років і 33,3 % дітей 8-10 років були позитивні результа-

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 1

Вікова структура обстежених в ПЛР з метою виявлення ДНК збудника кашлюку

Вік	2007 р.		2008 р.		6 міс. 2009 р.		Разом за 2007-2009 рр.	
	Всього обстежено	%	Всього обстежено	%	Всього обстежено	%	Всього обстежено	%
до 1 року	7	4,9	10	10,2	3	7,3	20	7,1
1 рік	13	9,0	9	9,2	5	12,2	27	9,5
2-3 роки	48	33,3	31	31,6	9	22,0	88	31,1
4-5 років	28	19,4	24	24,5	14	34,1	66	23,3
6-7 років	28	19,4	10	10,2	4	9,8	42	14,8
8-10 років	6	4,2	5	5,1	6	14,6	17	6,0
11-14 років	5	3,5	3	3,1	0		8	2,8
15-19 років	5	3,5	4	4,1	0		9	3,2
20 р. і старші	4	2,8	2	2,0	0		6	2,1
Всього	144	100,0	98	100,0	41	100,0	283	100,0

ти. Ці дані узгоджуються з віковим розподілом захворюваності на кашлюк в останні роки, коли відбулась інтенсифікація епідемічного процесу серед дітей 6-7 років на фоні високих показників захворюваності наймолодших дітей [8].

У 2008 р. рівень захворюваності на кашлюк у м. Донецьку і області знизився, і, відповідно, зменшився обсяг досліджень з метою ідентифікації збудника кашлюку в ПЛР і знизилась частота позитивних результатів. Всього було обстежено 98 осіб, у тому числі у 16,3 % обстежених ідентифікували *B. pertussis*, що в 1,5 разу менше, ніж у попередньому році. Частіше за всіх були уражені немовлята: із 10 обстежених у половини ідентифікували ДНК збудника кашлюку. Одна п'ята частка обстежених дітей віком 4-5 і 8-10 років були вра-

жені кашлюком. Школярі молодшого віку (6-7 років) у 10 % випадків мали позитивні результати, що в 3,2 разу рідше, ніж у попередньому році. Однак, їх кількість і частка в структурі обстежених також знизилась з 19,4 % (28 осіб) у 2007 р. до 10,2 % (10 осіб) у 2008 р.

При однаковій частоті обстежень осіб віком 1 рік у 2007 і 2008 рр. (9,0 і 9,2 % відповідно) зареєстровано зниження у 4,2 разу позитивних знахідок, що можна розцінити як достовірне скорочення циркуляції збудника у цій віковій групі у 2008 р. Зменшення частоти виділення збудника в 2,1 разу констатували також у групі дітей 2-3 років, а саме з 20,8 % у 2007 р. до 9,7 % у 2008 р. при однаковій частці осіб цього віку у віковій структурі обстежених (33,3 і 31,6 % відповідно в ці роки).

Таблиця 2

Результати обстеження методом ПЛР для виявлення ДНК *B. pertussis* осіб різного віку в Донецькій області у 2007-2009 рр.

Вік	2007 р.			2008 р.			6 міс. 2009 р.			Разом за 2007-2009 рр.		
	Всього обстежено	У т.ч. з позитивним результатом		Всього обстежено	У т.ч. з позитивним результатом		Всього обстежено	У т.ч. з позитивним результатом		Всього обстежено	У т.ч. з позитивним результатом	
		абс. число	%		абс. число	%		абс. число	%		абс. число	%
до 1 року	7	1	14,3	10	5	50,0	3	1	33,3	20	7	35,0
1 рік	13	6	46,2	9	1	11,1	5	0	0,0	27	7	25,9
2-3 роки	48	10	20,8	31	3	9,7	9	1	11,1	88	14	15,9
4-5 років	28	7	25,0	24	5	20,8	14	4	28,6	66	16	24,2
6-7 років	28	9	32,1	10	1	10,0	4	2	50,0	42	12	28,6
8-10 років	6	2	33,3	5	1	20,0	6	3	50,0	17	6	35,3
11-14 років	5	0	0,0	3	0	0,0	0	0	0,0	8	0	0,0
15-19 років	5	0	0,0	4	0	0,0	0	0	0,0	9	0	0,0
20 р. і старші	4	0	0,0	2	0	0,0	0	0	0,0	6	0	0,0
Всього	144	35	24,3	98	16	16,3	41	11	26,8	283	62	21,9

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Серед дітей 8-10 років відсоток підтвердження кашлюку досяг досить високих значень при незначній абсолютній кількості обстежених, а саме 33,3 % серед 6 обстежених осіб у 2007 р., 20,0 % серед 5 осіб у 2008 р. та 50,0 % серед 6 осіб у 2009 р. Це, імовірно, свідчить про високий рівень клінічної діагностики кашлюку лікарями, що направляють дітей в лабораторію для підтвердження діагнозу в ПЛР.

За 6 місяців 2009 р. помічена подальша тенденція до зниження обсягів досліджень в ПЛР (було обстежено 41 особу) при тому, що рівень захворюваності на кашлюк порівняно з першим півріччям 2008 р. не змінився. Однак, рівень виділення «маркерів» збудника кашлюку був найвищим за весь проаналізований період – 26,8 %.

Це може свідчити про підвищення прицільності обстежень на кашлюк, покращення рівня кваліфікації лікарів відносно клінічної діагностики кашлюкової інфекції.

Частіше всього ДНК збудника виділяли у вікових групах до 1 року, 6-7 і 8-10 років з незначною кількістю обстежених (3-6 осіб), з яких від половини до третини дітей мали позитивний результат. Серед 5 осіб віком 1 рік збудник кашлюку не ідентифікували жодного разу. Серед дітей 4-5 та 2-3 років, що мали найбільшу питому вагу у структурі обстежених, 28,6 та 11,1 % відповідно були ідентифікованими кашлюковим збудником.

В середньому за всі проаналізовані роки *B. pertussis* виділялась методом ПЛР у 21,9 % обстежених, найчастіше – у вікових групах епідемічного ризику. А саме 35,0 % обстежених дітей віком до 1 року, 25,9 % – віком 1 рік, 28,6 % – віком 6-7 років мали позитивний результат, що в цілому корелює з рівнем захворюваності осіб різного віку. Серед дітей старшого віку (11-14 років), підлітків і дорослих збудник не був ідентифікований жодного разу, можливо, через незначну кількість обстежених у цих групах, що зумовлено не стільки незначним рівнем циркуляції збудника, скільки низьким рівнем клінічно виражених форм кашлюкової інфекції серед них, що не потребувало лабораторного обстеження осіб цього віку.

Висновки

1. Використання ПЛР для виявлення ДНК *B. pertussis* є інформативним і об'єктивним методом лабораторного підтвердження діагнозу кашлюкової інфекції.

2. Частота виявлення ДНК збудника кашлюку в ПЛР серед обстежених осіб різного віку коре-

лювала з рівнем захворюваності на кашлюк у Донецькому регіоні.

3. Для покращення стану лабораторної діагностики кашлюку необхідне широке впровадження в практику охорони здоров'я нових сучасних методів дослідження, зокрема ПЛР як прямого методу ідентифікації ДНК збудника кашлюку.

Література

1. Петрусевич Т.В., Семенюк О.М. Сучасні особливості епідемічного процесу кашлюку в Україні // Сучасні інфекції. – 2007. – № 3. – С. 42-45.
2. Романенко Т.А., Колеснікова І.П., Сусідко В.В. Діагностика кашлюку у комплексі протиепідемічних заходів // Профілактична медицина. – 2009. – № 3. – С. 20-24.
3. К вопросу о повышении эффективности бактериологического метода диагностики коклюшной инфекции / Зверякина Н.Н., Ценева Г.Я., Курова Н.Н. и др. // Клини. лаб. диагностика. – 2002. – № 2. – С. 44-45.
4. Comparison of polymerase chain reaction, culture, and Western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection / Grimprel E., Begue P., Anjak I. et al. // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31. – P. 2745-2750.
5. Применение новой тест-системы для диагностики коклюшной инфекции / Л.В. Феклисова, Г.В. Спирина, Т.С. Шобухова и др. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2000. – № 2. – С. 59-61.
6. Бабаченко И.В. Клинико-лабораторные особенности коклюшной инфекции у детей в современных условиях: Автореф. дис. ... д. мед. н. – Санкт-Петербург, 2007. – 39 с.
7. Применение статистических методов в эпидемиологическом анализе / Е.Д. Савилов, Л.М. Мамонтова, В.А. Астафьев, С.Н. Жданова – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 112 с.
8. Романенко Т.А. Визначення вікових груп ризику захворюваності на кашлюк у сучасний період // Університетська клініка. – 2008. – Т. 4, № 2. – С. 113-117.

USE OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) FOR DIAGNOSTICS OF WHOOPING-COUGH

T.A. Romanenko, T.A. Bilomerya, R.A. Kozlovskaya

SUMMARY. In the article first in Ukraine experience of the use of polymerase chain reaction is generalized for laboratory confirmation of whooping-cough infection in the Donetsk region for 2007-2009. Frequency of selection of exciter of whooping-cough in PCR among the inspected persons of different age correlated with the level of morbidity a whooping-cough. Expedience of wide introduction of PCR is shown for early diagnostics of whooping-cough, as informing and objective method of authentication of exciter of whooping-cough.

Key words: whooping-cough, diagnostics, PCR, groups of ages, morbidity.

Отримано 3.02.2010 р.