

Федеральное государственное учреждение науки  
«Московский научно-исследовательский институт  
эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н.Габричевского»  
Федеральной службы по надзору в сфере  
защиты прав потребителей и благополучия человека  
(ФГУН МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского  
Роспотребнадзора)



*На правах рукописи*

ГРИТЧИНА АННА ВИКТОРОВНА

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ КАМПИЛОБАКТЕРОВ  
В БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ  
КЛИНИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИОННОЙ БОЛЬНИЦЫ.**

**03.00.07 - микробиология**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Липецк - 2006

**Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.**

**Научный руководитель:**

Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник

Л.В. Пожалостина

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук, профессор К.И. Савицкая

Доктор медицинских наук, профессор Д.Д. Меньшиков

**Ведущая организация:** ГОУДПО «Российская медицинская Академия последипломного образования» Росздрава.

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2006 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном государственном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН Московский НИИ эпидемиологии микробиологии им. Г.Н. Габричевского.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

С. Ю. Комбарова

## **Общая характеристика работы**

### **Актуальность проблемы**

Среди острых кишечных инфекций (ОКИ) в настоящее время все большее значение приобретают заболевания, вызванные возбудителями, роль которых в патогенезе ОКИ у человека установлена сравнительно недавно. Среди них важное место занимает кампилобактериоз ввиду его широкой распространенности, постоянной тенденции к росту заболеваемости и наносимого им значительного социально-экономического ущерба. По данным ВОЗ, во многих зарубежных странах кампилобактериоз является наиболее частой этиологической формой в структуре ОКИ и в зависимости от региона на его долю приходится от 3 до 73 % всех острых кишечных инфекций [Сафонова Т.Б. и др., 1988; Иванов В.П. и др., 1991; Пожалостина Л.В., 2004; Newell D. et al., 1998; Abbott S.L. et al., 2005; Clark C.G. et al., 2005].

По инициативе ВОЗ изучение кампилобактериоза было включено в национальные программы по борьбе с диарейными заболеваниями примерно в 100 странах мира. Средние показатели заболеваемости кампилобактериозом в западных государствах, имеющих собственные системы биомониторинга, составляют 50 - 100 на 100 тыс. населения. В странах, где целенаправленный мониторинг отсутствует, статистические данные заболеваемости отличаются от реальной картины в несколько раз [Куликовский А.В., 1985; Минаев В.И., 1993; Иванов В.П. и др., 1995; Пожалостина Л.В., 2004].

Кампилобактеры широко распространены в окружающей среде, среди животных и птиц. Они входят в состав как аллохтонной, так и аутохтонной микрофлоры. Среди кампилобактеров есть как представители нормальной

микрофлоры, так и патогенные для животных и человека виды, вызывающие патологию репродуктивной сферы и диарейные заболевания [Хазенсон Л.Б и др., 1985; Иванов В.П., и др., 1995; Taylor N.S. et al., 1989; Michaud S. et al., 2005]. Кампилобактериоз является серьезной проблемой для ветеринарной службы, так как это заболевание наносит значительный экономический ущерб животноводству. В настоящее время для его профилактики в неблагополучных районах используется вакцинация [Сафонова Т.Б. и др., 1988; Иванов В.П. др., 1995].

Изучение кампилобактериоза в Российской Федерации начато с большим опозданием, что сопряжено с рядом причин: в первую очередь с трудностями и высокой стоимостью лабораторной диагностики, связанными с особенностями культивирования кампилобактеров, а также с разнообразием клинических проявлений заболевания и многообразием путей и факторов передачи возбудителей [Иванов В.П. и др., 1991; Минаев В.И., 1993].

На данный момент кампилобактериозная инфекция, широко распространенная во всем мире, и по частоте выявления сопоставимая с сальмонеллезом, в РФ в практических лабораториях почти не диагностируется. Так, в 2002 г по всей России зарегистрирован 461 случай этой инфекции, показатель на 100 тыс. населения составил 0,32 [Пожалостина Л.В., 2004]. Для сравнения за тот же период времени заболеваемость сальмонеллезом составила 49 480 и 34,27 соответственно.

По данным литературы, до июля 2002 года на территории Липецкой области случаев заболевания кампилобактериозом зарегистрировано не было. Однако имелись предпосылки, указывающие на необходимость проведения микробиологического мониторинга возбудителя данной инфекции: стабильно высокий уровень заболеваемости острыми кишечными инфекциями, значительный процент ОКИ неустановленной этиологии, высокий уровень развития промышленного птицеводства на территории области, доступность продуктов птицеводства (основного фактора передачи кампилобактериоза) для различных слоев населения.

В связи с этим, разработка и усовершенствование современных, достоверных методов лабораторной диагностики кампилобактериоза, а также использование новых ускоренных тестов для индикации антигенов возбудителя сохраняет свою актуальность. Не менее важно унифицировать методы оценки чувствительности кампилобактеров к антибактериальным средствам с целью их рационального применения для лечения различных форм кампилобактериоза, контроля эффективности этиотропной терапии, а также использования антибиотиков в качестве селективных добавок к питательным средам для культивирования кампилобактеров.

### **Цель исследования**

Разработка системы микробиологического мониторинга кампилобактеров с использованием комплекса методов микробиологической диагностики и оценка ее эффективности.

### **Задачи исследования**

1. Организовать бактериологическое исследование на кампилобактеры в бактериологической лаборатории инфекционной больницы и усовершенствовать лабораторную диагностику кампилобактериоза.
2. Выявить циркуляцию и динамику высеваемости кампилобактеров среди больных ОКИ на территории Липецкой области, проанализировать возрастной состав больных, особенности клинического течения и распространения кампилобактериоза.
3. Определить чувствительность к антибиотикам выделенных штаммов кампилобактеров.
4. Использовать реакцию коагутинации в общей схеме лабораторной диагностики кампилобактериоза и изучить эффективность данного экспресс - метода.

5. Определить роль микробиологического мониторинга кампилобактеров в клинико-лабораторной диагностике и лечении кампилобактериоза.
6. Разработать рекомендации по организации лабораторной диагностики кампилобактериоза в бактериологических лабораториях ЛПУ.

### **Научная новизна**

Получены новые данные о циркуляции кампилобактеров среди больных ОКИ на территории Липецкой области, проанализированы возрастной состав больных, особенности клинического течения и распространения кампилобактериоза.

Мониторинг антибиотикочувствительности выделенных кампилобактеров позволил выявить штаммы резистентные к препаратам, наиболее значимым для лечения заболевания, а также обнаружить культуры возбудителя, устойчивые к налидиксовой кислоте, используемой в схеме идентификации кампилобактеров.

Применение реакции коаггутинации с кампилобактериозным диагностикумом показало ее эффективность как ускоренного теста в сравнении с бактериологическим методом при клинико-лабораторной диагностике ОКИ.

### **Практическая значимость работы.**

Благодаря внедрению бактериологической диагностики кампилобактериоза в лаборатории клинической инфекционной больницы, впервые в 2002 г. выявлены и зарегистрированы случаи кампилобактериоза на территории Липецкой области.

На основании полученных данных о распространении кампилобактериоза, характеристики выделенных штаммов и показателей их резистентности к антибактериальным препаратам, разработаны практические

рекомендации по организации лабораторных исследований на кампилобактеры в бактериологической лаборатории клинической инфекционной больницы, способствующие повышению эффективности диагностики острых кишечных инфекций, улучшению качества лечебно-диагностических мероприятий.

Результаты работы были учтены при составлении методических рекомендации «Бактериологическая диагностика кампилобактериоза» Липецк, 2005. – 18 с.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Кампилобактериозная инфекция занимает одно из ведущих мест в структуре ОКИ в Липецкой области. Показатель заболеваемости на 100 тысяч населения составил 1,46 в 2002 году и 3,34 в 2003 году. Максимальные показатели заболеваемости наблюдаются у детей первого года жизни - 147,6 на 100 тысяч населения и у детей 1-2 лет - 43,05 на 100 тысяч населения. Имеется сходство особенностей распространения данной нозологии с другими регионами РФ.
2. Штаммы кампилобактеров, выделенные в Липецкой области, имеют высокий уровень чувствительности к большинству тестируемых антибиотиков за исключением цефалоспоринов 1 поколения (цефалексин, цефазолин).
3. Совместное применение реакции коагутинации в качестве сигнального скринингового экспресс-метода и бактериологического культивирования кампилобактеров существенно повышает эффективность микробиологической диагностики кампилобактериоза.

### **Апробация работы**

Апробация диссертационной работы проведена на заседании Секции Ученого Совета ФГУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» 11 мая 2006 г.

Результаты исследований доложены на:

- Всероссийской научно-практической конференции «Медицинская микробиология - XXI век» (г. Саратов, 28-30 сентября 2004г.);

- Российской научно-практической конференции с международным участием “Роль клинической микробиологии в профилактике внутрибольничных инфекций” (г. Москва, 26–27 октября 2004 г.);

- Межрегиональной научно-практической конференции “Актуальные вопросы повышения эффективности здравоохранения” (г. Липецк, 22 апреля 2005г.);

- III (VII) съезде Научного общества специалистов клинической лабораторной диагностики (г. Москва, 11 октября 2005г.);

### **Публикации**

По теме диссертации опубликованы 7 печатных работ, в том числе в рецензируемых журналах - 1, в материалах конференций – 5, методические рекомендации – 1.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 100 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 17 таблицами, 4 рисунками.

Библиографический указатель включает 164 источника, в том числе 66 зарубежных авторов.

## **Содержание работы**

### **Материалы и методы исследования**

В период с 2002 по 2005 год проведено обследование 11607 больных обоего пола в возрасте от 1 месяца до 77 лет, госпитализированных в клиническую инфекционную больницу г. Липецка с симптомами острой кишечной инфекции.

В комплексном обследовании больных принимали участие врачи - инфекционисты, педиатры, реаниматологи и другие специалисты.

Среди обследованных госпитализированы в отделение интенсивной терапии и реанимации (ОИТиР) 2018 человек ( $17,4 \pm 0,4\%$ ) из них 1844 ребенка и 174 взрослых (табл. 1).

Таблица 1

### Возрастная характеристика обследованных больных

Возраст	Количество больных		в т.ч. из ОИТиР	
	Абс. число	$\% \pm m$	Абс. число	$\% \pm m$
Взрослые всего	4192	$36,1 \pm 0,5$	174	$4,2 \pm 0,3$
Дети всего в том числе:	7415	$63,9 \pm 0,5$	1844	$24,9 \pm 0,5$
До 1 года	3423	$46,2 \pm 0,6$	969	$28,3 \pm 0,8$
От 1 г.1м. до 2 лет	1323	$17,8 \pm 0,4$	438	$33,1 \pm 1,3$
От 2 л.1м. до 3 лет	1218	$16,4 \pm 0,4$	197	$16,2 \pm 1,0$
От 3 л.1м. до 14 лет	1451	$19,6 \pm 0,5$	240	$16,5 \pm 1,0$
ИТОГО	11607	100	2018	$17,4 \pm 0,4$

Всего обследовано 7415 ( $63,9 \pm 0,5\%$ ) детей и 4192 ( $36,1 \pm 0,5\%$ ) взрослых. Среди детей преобладали – дети до 1 года – 3423 человека ( $46,2 \pm 0,6\%$ ). Удельный вес детей от 1 года до 2 лет составил  $17,8 \pm 0,4\%$ , от 2 до 3 лет -  $16,4 \pm 0,4\%$ , от 3 до 14 лет -  $19,6 \pm 0,5\%$ .

В проводимых исследованиях использовали штаммы кампилобактеров, выделенные от обследованных больных (табл. 2), а также контрольные штаммы *S.jejuni* ATCC 11322 (диски Microtrol производства Becton Dickinson, США).

Таблица 2

### Штаммы кампилобактеров, выделенные от больных

Штаммы кампилобактеров	Количество штаммов	
	Абс. число	$\% \pm m$
<i>S. jejuni</i>	159	$73,3 \pm 3,5$
<i>S. coli</i>	10	$4,6 \pm 1,4$

Campylobacter spp. (без видовой идентификации)	48	22,1±2,8
Всего	217	100

При проведении бактериологического исследования испражнений от больных ОКИ для выявления кампилобактеров руководствовались действующими инструкциями по клинической и лабораторной диагностике кампилобактериоза (1989, 1991 гг.), рекомендациями для врачей Иванова В.П., Бойцова А.Г., Поруна А.А. «Применение фильтров для выделения возбудителей кампилобактериоза» (Л., 1991 г.).

Материалом для исследования служили нативные фекалии больных, реже - содержимое прямой кишки, забранное с помощью ректальной петли. В случае невозможности своевременной доставки материала для исследования в лабораторию, он помещался в транспортную среду Кэри-Блер производства ЗАО НИЦФ г. Санкт - Петербург.

В качестве среды первичного посева использовали отечественную питательную среду кампилобакагар производства Государственного научного центра прикладной микробиологии г. Оболенск с добавлением аэротолерантных добавок: железа II сульфата и пирувата натрия.

Для выделения кампилобактеров применяли метод ядерных фильтров, имеющий ряд значительных преимуществ по сравнению с посевом на селективные питательные среды. Использовали фильтры с диаметром пор 0,46 и 0,55 мкм производства Объединенного института ядерных исследований г. Дубна. Отказ от внесения в среду селективных факторов (антибиотиков) способствовал сокращению срока выделения кампилобактеров до 24 часов инкубации (54,2% штаммов), возможности обнаружения разных видов кампилобактеров; росту возбудителя в чистой культуре, что значительно упрощало учет результатов посева.

Посевы инкубировали при температуре 42,5°C в микроаэрофильных и капнофильных условиях в специальных системах для инкубации Genbox фирмы bio Merieux (Франция) с использованием газогенерирующих пакетов

«Кампилогаз» производства ООО ИНКО г. Санкт - Петербург, предназначенных для создания искусственной атмосферы, обедненной кислородом и обогащенной углекислым газом. Состав искусственной атмосферы, генерируемой пакетом «Кампилогаз» в сосуде объемом 2,5-3 л : O<sub>2</sub> - 5-7 % об., CO<sub>2</sub> 8-10 % об. Длительность инкубации составляла 48 часов с обязательным просмотром посевов через 24 часа.

Нами апробирована первичная идентификация колоний, подозрительных на кампилобактериозные, с использованием латексного агглютинационного набора *Campylobacter test kit* фирмы OXOID (Великобритания).

Методика основана на взаимодействии латексных частиц тестовой поверхности, сенсibilизированных кроличьими кампилобактериозными антителами, с поверхностными антигенами отобранных клеток, подозрительных на кампилобактериозные.

Для видовой идентификация кампилобактеров использовали современные диагностические системы (стрипы) *api Campy* фирмы bio Merieux (Франция), позволяющие одномоментное проведение комбинации ферментативных и ассимиляционных тестов, а также тестов на чувствительность к антибиотикам. Учет и интерпретацию результатов проводили визуально через 24 часа инкубации при 35-37°C, сравнивая их с идентификационной таблицей.

Ни в России, ни за рубежом до настоящего времени не существует нормативного документа, четко регламентирующего процедуру определения и учет результатов чувствительности кампилобактеров к противомикробным препаратам. Французское общество микробиологов (SFM) и Британское общество антимикробной терапии (BSAC) дают лишь временные рекомендации, говоря о сложности проведения корреляции между МИК и диаметром зон задержки роста, NCCLS также не дает точных рекомендаций.

Определение чувствительности проводили на среде Мюллера - Хинтона производства ЗАО НИЦФ г. Санкт - Петербург с добавлением 5% эритроцитарной массы и 0,2% магния хлорида [Иванов В.П. др., 1995] диско - диффузионным методом с использованием стандартных дисков.

Чувствительность изучали к следующим антибиотикам: ампициллину, цефазолину, цефалексину, цефепиму, имипенему, гентамицину, офлоксацину, эритромицину, тетрациклину, хлорамфениколу, налидиксовой кислоте (ЗАО НИЦФ г. Санкт - Петербург).

Посевы инкубировали при температуре + 42,5°C в течение 24-48 часов в микроаэрофильных условиях. Учет результатов проводили путем измерения диаметров зон задержки роста вокруг диска с тем или иным антибиотиком. Интерпретация результатов осуществлялась согласно указаниям производителей дисков.

Для проведения контроля качества определения антибиотикорезистентности выделенных кампилобактеров использовался контрольный штамм *S.jejuni* ATCC 11322.

В качестве сигнальной экспресс - детекции кампилобактериоза нами была применена реакция коаггутинации (РКА), с целью оценки ее эффективности в общей схеме лабораторной диагностики кампилобактериозных диарей, а также изучения частоты встречаемости кампилобактеров и их антигенов совместно с другими возбудителями ОКИ. Преимущество данного метода состоит в том, что его можно использовать не только с первых дней заболевания и на протяжении всего острого периода, но также еще в течение 1-2 недель после прекращения бактериовыделения и на фоне антибиотикотерапии.

РКА основана на способности поверхностного белка А стафилококка (штамм Cowan 1) сорбировать на себе специфические IgG антитела, которые при смешивании с субстратом, содержащим соответствующий антиген, агглютинируют.

Для обнаружения специфических антигенов кампилобактеров использовали «Диагностикум для определения антигенов кампилобактеров в реакции коаггутинации на стекле, жидкий» производства НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (руководитель лаборатории проф. Ю.А.Белая). Препарат представляет собой стабилизированную взвесь

стафилококков – носителей белка А (штамм Cowan 1), связанных со специфическими антителами IgG<sub>1,2,4</sub> к возбудителям кампилобактериоза.

Исследования проводили согласно наставлению по применению диагностикумов для определения антигенов возбудителей кишечных инфекций в реакции коаггутинации на стекле. Учет результатов осуществляли по 4-х крестной шкале.

Нами впервые было проведено определение антигенов кампилобактеров в испражнениях больных ОКИ с применением системы для иммуноферментного анализа RIDASCREEN® Campylobacter ELISA производства немецкой фирмы R – biopharm AG совместно с реакцией коаггутинации и бактериологическим методом диагностики кампилобактериоза. Данный диагностический тест характеризуется высокой специфичностью к антигенам Campylobacter, простотой проведения процедуры исследования, позволяющей в течение двух часов выявить патогены, в том числе не поддающиеся культивированию. Исследования осуществляли согласно прилагаемой инструкции по применению.

Статистическую обработку полученных данных проводили в соответствии с общепринятыми методами медицинской статистики [Шевченко И.Т. и др., 1970] при этом определяли среднее арифметическое и его ошибку, различия считали достоверными при  $t \geq 2$ . При проведении расчетов использовали программу Microsoft Excell.

### **Результаты исследований и их обсуждение**

#### **Динамика высеваемости кампилобактеров за 2002 -2005 гг.**

С 2002 по 2005гг. нами выделено 217 культур кампилобактеров от 195 больных. Динамика высеваемости кампилобактеров с 2002 по 2005 гг. представлена в табл. 3.

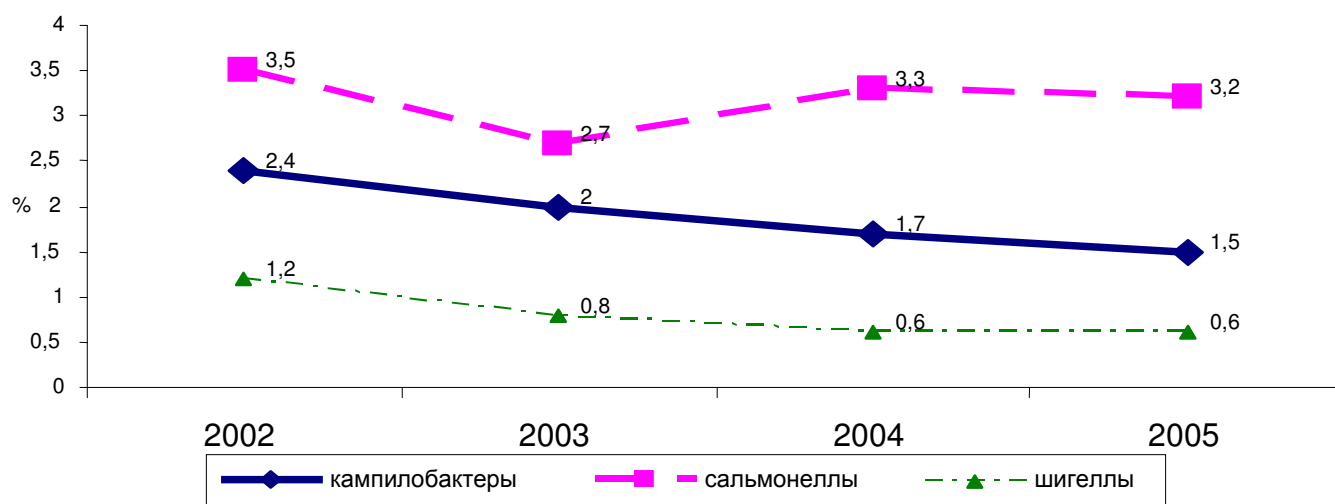
Таблица 3

#### **Высеваемость кампилобактеров 2002 - 2005 гг.**

№ п/п	Год	Выполнено исследований	Выделено культур	Высеваемость в %±m
-------	-----	------------------------	------------------	--------------------

1.	2002	1996	48	$2,4 \pm 0,14$
2.	2003	3272	65	$2,0 \pm 0,13$
3.	2004	3438	58	$1,7 \pm 0,12$
4.	2005	3173	46	$1,5 \pm 0,11$
	<b>ИТОГО</b>	<b>11879</b>	<b>217</b>	<b><math>1,8 \pm 0,12</math></b>

Высеваемость кампилобактеров с 2002 по 2005 гг. в среднем составила  $1,8 \pm 0,12\%$ , что более чем в 2 раза превышает уровень высеваемости шигелл за анализируемый период ( $0,8\%$ ), но уступает высеваемости сальмонелл ( $3,2\%$ ). При общей тенденции снижения заболеваемости ОКЗ, вызванной бактериальными патогенами, в Липецкой области наблюдается постепенное снижение уровня высеваемости как классических кишечных возбудителей (сальмонелл, шигелл), так и кампилобактеров с  $2,4 \pm 0,14\%$  в 2002 г. до  $1,5 \pm 0,11\%$  в 2005 г., достоверность различий  $t \geq 2$  (рис. 1).



**Рисунок 1.** Динамика высеваемости кампилобактеров, сальмонелл и шигелл в КДЛ МУЗ «Клиническая инфекционная больница» г. Липецка 2002-2005 гг.

Процентные показатели выделения кампилобактеров от общего числа обследованных в различных возрастных категориях распределились следующим образом: дети до 1 года -  $2,4 \pm 0,3\%$ , от 1 до 2 лет -  $3,5 \pm 0,5\%$ , от 2 до 3 лет -  $0,9 \pm 0,1\%$ , от 3 до 14 лет -  $1,5 \pm 0,3\%$  и взрослые -  $0,8 \pm 0,1\%$  (табл. 4).

Таблица 4

#### Высеваемость кампилобактеров у обследуемых больных

Возраст	Количество обследованных	Количество больных выделявших кампилобактеры	
		Абсолютное число	%±m
Взрослые (старше 14 лет)	4192	34	0,8±0,1
Дети всего, в том числе	7415	161	2,2±0,2
До 1 года	3423	83	2,4±0,3
От 1 г.1м. до 2 лет	1323	46	3,5±0,5
От 2л.1м. до 3 лет	1218	11	0,9±0,1
От 3 л.1м. до 14 лет	1451	21	1,5±0,3
ИТОГО	11607	195	1,7±0,1

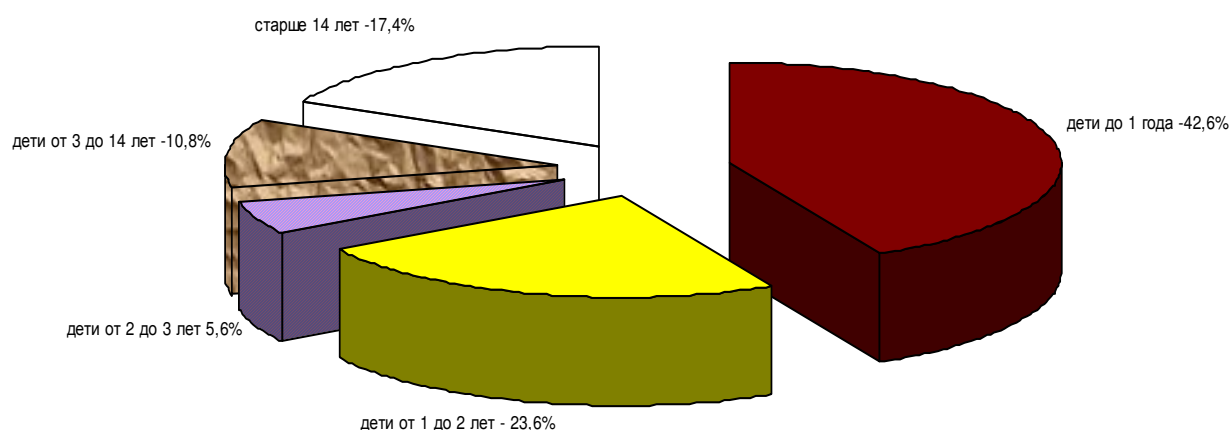
Изучение возрастной структуры больных кампилобактериозом в 2002 - 2005 гг. показало, что удельный вес обнаружения кампилобактеров у детей до 14 лет почти в 4,8 раза выше, чем у взрослых (соответственно  $82,6\pm 2,7\%$  и  $17,4\pm 2,7\%$ ).

Таблица 5

#### Возрастная структура больных кампилобактериозом (2002-2005 гг.)

Возраст	Количество больных выделявших кампилобактеры	
	Абсолютное число	%±m
Взрослые (старше 14 лет)	34	17,4±2,7
Дети всего, в том числе	161	82,6±2,7
До 1 года	83	42,6±3,6
От 1 г.1м. до 2 лет	46	23,6±3,1
От 2л.1м. до 3 лет	11	5,6±1,7
От 3 л.1м. до 14 лет	21	10,8±2,2
ИТОГО	195	100

Процент выделения кампилобактеров у детей до 1 года от общего числа выделивших возбудитель составил  $42,6\pm 3,6\%$ , от 1 до 2 лет –  $23,6\pm 3,1\%$ , от 2 до 3 лет –  $5,6\pm 1,7\%$ , от 3 до 14 лет –  $10,8\pm 2,2\%$  (рис. 2).



**Рисунок 2. Возрастная структура лиц, выделивших кампилобактеры.**

**МУЗ «Клиническая инфекционная больница» г. Липецка, 2002-2005 гг.**

Подобное возрастное распределение больных наблюдалось ежегодно с 2002 по 2005 гг., что позволило выделить группу повышенного риска при кампилобактериозе в Липецкой области – это дети до 2 лет ( $66,2 \pm 3,4\%$  от всех заболевших).

Полученные результаты соответствуют данным отечественных исследователей, изучавших особенности распространения кампилобактериоза в других регионах Российской Федерации [Иванов В.П. и др., 1995; Покровский В.И., 1999].

### **Анализ видовой структуры, выделенных кампилобактеров.**

На основании изучения биохимических свойств выделенных культур кампилобактеров проведена видовая идентификация 169 штаммов (табл. 6). В результате определено 2 вида возбудителя: *S. jejuni* и *S. coli*. Кроме того, среди идентифицированных штаммов отмечено значительное преобладание вида *S. jejuni* ( $94,1 \pm 1,8\%$ ) над *S. coli* ( $5,9 \pm 1,8\%$ ).

Таблица 6

### **Видовое распределение выделенных штаммов кампилобактеров**

Штаммы кампилобактеров	всего	%±m
С видовой идентификацией в том числе:	169	77,9±2,8
<i>Campylobacter jejuni</i>	159	94,1±1,8
<i>Campylobacter coli</i>	10	5,9±1,8
Без видовой идентификации ( <i>Campylobacter spp.</i> )	48	22,1±2,8
ВСЕГО	217	100

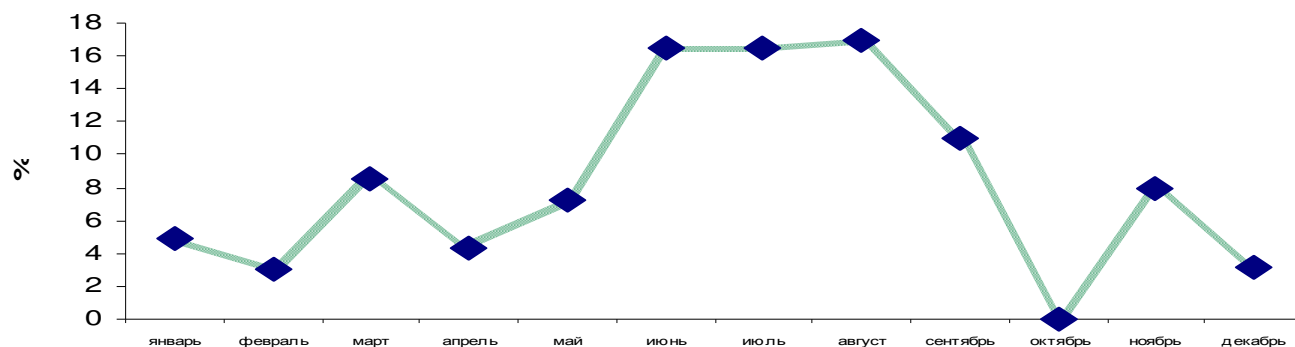
Полученные данные соответствуют литературным источникам, свидетельствующим об актуальности для патологии человека именно термофильных видов *C.jejuni* и *C.coli*, причем *C.jejuni* считается наиболее важным этиологическим агентом. В проведенном нами исследовании 24 случая тяжелых клинически выраженных форм кампилобактериоза были связаны с *C.jejuni* и лишь 1 случай ассоциирован с *C.coli*.

### **Особенности распространения кампилобактериоза в Липецкой области.**

Наблюдения, проведенные в течение 2002 – 2005гг. показали, что заболеваемость кампилобактериозом в Липецкой области носит спорадический характер с отсутствием вспышек и очагов распространения. Показатель заболеваемости на 100 тыс. населения составил 1,46 в 2002 году и 3,34 в 2003 году. Заболевания кампилобактериозом зарегистрированы на 10 административных территориях области: 9 районах и в городе Липецке. Интенсивность эпидемического процесса выше среди детского населения. Максимальные показатели заболеваемости наблюдались у детей первого года жизни (по данным на 11.2003г.) - 147,6 на 100 тысяч населения, что лишь на 30% ниже уровня заболеваемости сальмонеллезами и в 4,7 раза выше уровня дизентерии в этой возрастной группе; у детей 1-2 лет - 43,05 на 100 тысяч населения. Показатели заболеваемости в сельской местности в 1,74 раза выше, чем среди городских жителей [Фатина Н.М., Ярковская И.В., 2004].

Сезонная динамика случаев кампилобактериоза коррелирует с летним подъемом заболеваемости ОКИ, интенсивность в этот период возрастает в 2-3 раза.

На рисунке 3 показано, что пик выделения возбудителя приходится на летне-осенний период с июня по сентябрь (61 % всех выделенных штаммов).



**Рисунок 3. Суммарная месячная динамика высеваемости кампилобактеров. КИБ г. Липецк, 2003-2005гг.**

Характерной особенностью, выявленной трехлетним анализом сезонной динамики кампилобактериоза в Липецкой области, является отсутствие выделения кампилобактеров от больных в октябре с последующим появлением положительных находок в более холодные месяцы года.

### **Характеристика клинического течения кампилобактериоза.**

Согласно клиническим наблюдениям (по данным историй болезни), большинству пациентов, выделивших кампилобактеры, при поступлении в стационар ставили следующие диагнозы: “гастроэнтерит” –  $34,4 \pm 3,4\%$ , “энтероколит” –  $25,1 \pm 3,1\%$  и “энтерит” –  $13,8 \pm 2,5\%$ .

Большинство случаев заболевания характеризовалось острым началом с повышением температуры до фебрильных значений, появлением симптомов интоксикации и болей в животе. Рвота наблюдалась у трети пациентов. Ведущим синдромом болезни была диарея с различной частотой жидкого стула (от 2 до 10 раз в сутки).

Среди клинических форм кампилобактериоза преобладали среднетяжелые ( $76,9 \pm 3,0\%$ ). Тяжелые формы составили  $12,8 \pm 2,4\%$ , легкие –  $3,1 \pm 1,2\%$ , субклинические –  $7,2 \pm 1,9\%$  (табл.7).

**Клинические формы кампилобактериоза (по тяжести течения)**

№ п/п	Клинические формы	Всего больных		дети	взрослые
		абс.	%±m от числа больных		
1.	Субклинические	14	7,2±1,9	13	1
2.	Легкие	6	3,1±1,2	2	4
3.	Среднетяжелые	150	76,9±3,0	121	29
4.	Тяжелые	25	12,8±2,4	25	-
	ИТОГО	195	100	161	34

Тяжелые формы кампилобактериоза наблюдались у детей (25 больных), из них до 1 года - 21 случай, от 1 до 2 лет – 4 случая. У взрослых пациентов преобладали среднетяжелые (29 больных) и легкие (4 больных) формы инфекции.

Проявления дистального гемоколита имели место в 33,3±3,4% случаев (65 больных), среди детей – у 59 (36,7±3,8%), среди взрослых - у 6 (17,6±6,6%).

Явления токсикоза с эксикозом разной степени наблюдались у 12,8±2,4% больных кампилобактериозом детей в возрасте до 2 лет.

У двух пациентов (1,0±0,7%) в возрасте до 1 года были отмечены явления рецидивов кампилобактериоза через 3 недели от начала заболевания, что соответствует данным литературы о характерном рецидивирующем течении изучаемой инфекции у детей.

Какие-либо осложнения после перенесенного кампилобактериоза у обследуемых нами больных не наблюдали.

**Результаты определения чувствительности к антибиотикам штаммов кампилобактеров, циркулирующих в Липецкой области.**

Результаты определения антибиотикорезистентности выделенных штаммов кампилобактеров представлены в табл. 8.

Проведенные нами исследования показали, что наиболее высокий уровень резистентности кампилобактеров отмечается к цефалексину (100 %) – препарату, применяемому в качестве селективной добавки для культивирования данных возбудителей [Иванов В.П. и др. 1991], и цефазолину ( $96,8 \pm 1,6$  %), используемому для их идентификации.

Все выделенные культуры кампилобактеров были чувствительны к представителю карбапенемов - имипенему и цефалоспорины 4-го поколения - цефепиму. Выявлен достаточно высокий процент штаммов, чувствительных к хлорамфениколу ( $98,7 \pm 0,9$  %), офлоксацину ( $89,4 \pm 2,4$  %).

Поскольку эритромицин, по мнению некоторых авторов, считается наиболее оптимальным препаратом для лечения кампилобактериозной инфекции, особое значение придавалось оценке чувствительности микроорганизмов к этому антибиотику.

Исследования показали высокий процент чувствительных к эритромицину штаммов кампилобактеров -  $85,6 \pm 2,8$ %, устойчивых -  $3,8 \pm 1,5$ %, умеренно-устойчивых -  $10,6 \pm 2,4$ %.

Таблица 8

**Чувствительность штаммов кампилобактеров к антибиотикам  
(КИБ, г. Липецк, 2003 – 2005 гг.)**

№ п/п	Спектр антибиотиков	Количество штаммов кампилобактеров	Результаты определения чувствительности штаммов кампилобактеров к антибиотикам		
			Чувствительные	Умеренно - устойчивые	Резистентные
			%±m	%±m	%±m
1.	Ампициллин	160	$79,4 \pm 3,2$	$8,1 \pm 2,2$	$12,5 \pm 2,6$
2.	Цефазолин	124	$2,4 \pm 1,4$	$0,8 \pm 0,8$	$96,8 \pm 1,6$
3.	Цефалексин	25	-	-	$100 \pm 0,0$
4.	Цефепим	62	$100 \pm 0,0$	-	-
5.	Имипенем	62	$100 \pm 0,0$	-	-
6.	Гентамицин	156	$75,6 \pm 3,5$	-	$24,4 \pm 3,5$
7.	Офлоксацин	160	$89,4 \pm 2,4$	$1,9 \pm 1,1$	$8,7 \pm 2,2$
8.	Эритромицин	160	$85,6 \pm 2,8$	$10,6 \pm 2,4$	$3,8 \pm 1,5$

9.	Тетрациклин	36	33,3±7,97	38,9±8,2	27,8±7,6
10.	Хлорамфеникол	153	98,7±0,9	0,65±0,65	0,65±0,65
11.	Налидиксовая кислота	156	86,5±2,7	2,6±1,3	10,9±2,5

Важным показателем также является оценка уровня резистентности к налидиксовой кислоте. В результате проведенного исследования чувствительными к налидиксовой кислоте оказались 86,5±2,7% выделенных штаммов, устойчивыми - 10,9±2,5 %, умеренно-устойчивыми - 2,6±1,3%.

Обнаружение штаммов, устойчивых к налидиксовой кислоте, по мнению ряда исследователей, является «тревожным сигналом», так как наличие чувствительности к налидиксовой кислоте используется в схеме идентификации кампилобактеров.

#### **Применение ускоренных методов в микробиологической диагностике кампилобактериоза.**

В 2004-2005гг. параллельно с бактериологическим методом было проведено 816 исследований копрофильтратов от больных ОКИ с использованием диагностикума для определения антигенов кампилобактеров в реакции коаггутинации на стекле.

Полученные результаты отражены в табл. 9. Как следует из данных, представленных в таблице, антиген кампилобактеров обнаружен в 103 из 816 случаев (12,6±1,16%), что значительно превышает процент положительных находок при классическом культивировании данных возбудителей на питательных средах - 19 из 816 (2,33 ±0,5%).

Таблица 9

#### **Обнаружение кампилобактеров бактериологическим методом и в РКА**

Методы исследования	Количество исследований	Положительный результат	
		Абсолютное количество	%±m
Бактериологический	816	19	2,33±0,5

метод			
Реакция коаггутинации	816	103	12,6±1,16

В табл. 10 представлено сравнение результатов РКА и бактериологического метода. Положительный результат РКА совместно с бактериологическим выделением кампилобактеров наблюдался в 17 случаях (2,1±0,5%).

Положительный результат РКА при отсутствии роста культуры кампилобактеров отмечен у 86 обследованных больных (10,5±1,1%), у 49 (60,5%) из которых наблюдались симптомы острого энтероколита, у 34 (39,5%) - острого гастроэнтерита.

Таблица 10

### Сравнение результатов РКА и бактериологического метода.

Сопоставление результатов		Абсолютное значение	%±m
РКА	Бактериологический метод		
+	+	17	2,1±0,5
+	-	86	10,5±1,1
-	-	711	87,1±1,17
-	+	2	0,3±0,2
ИТОГО		816	100

« + » - положительный результат РКА или положительный высев

*Campylobacter*,

« - » - отрицательный результат РКА или отрицательный высев

*Campylobacter*.

Отсутствие антигенов кампилобактеров у пациентов, обследованных в РКА, совместно с отрицательным результатом бактериологического исследования имело место в 711 случаях (87,1±1,17%). У 2 больных до 2-х лет с симптомами энтероколита (0,3±0,2%) наблюдался отрицательный результат

РКА при положительном бактериологическом высеве кампилобактеров, что, вероятно, связано с антигенными особенностями выделенных штаммов.

Было проведено дополнительное (через 7 - 10 дней) исследование копрофильтратов от 17 пациентов с первично положительными РКА и бактериологическим выделением кампилобактеров после проведенной антибиотикотерапии. В результате специфические антигены кампилобактеров обнаружены у всех повторно обследуемых лиц, что подтверждает эффективность применения реакции коаггутинации по окончании острого периода заболевания и на фоне антибиотикотерапии.

Результаты впервые проведенных нами исследований испражнений больных ОКИ с применением системы для иммуноферментного анализа RIDASCREEN® Campylobacter ELISA совместно с реакцией коаггутинации и бактериологическим методом диагностики кампилобактериоза представлены в табл. 11.

Таблица 11

#### Сравнение результатов ИФА, РКА и бактериологического метода.

Наименование методов диагностики	Количество обследованных больных	Положительный результат	
		Абсолютное количество	%±m
Бактериологический метод	90	1	1,1±1,1
РКА	90	5	5,6±2,4
ИФА	90	4	4,4±2,17

При обследовании 90 больных ОКИ методом ИФА антигены кампилобактеров были обнаружены у 4 (4,4±2,17%). В результате применения РКА у тех же 90 больных положительный результат отмечен у 5 пациентов (5,6±2,4%). При бактериологическом обследовании тех же пациентов на кампилобактеры возбудитель был выделен лишь в одном случае (1,1±1,1%).

Таким образом, применение реакции коаггутинации в общей схеме лабораторной диагностики кампилобактериоза подтвердило ее высокую

информативность и перспективность в качестве экспресс-метода диагностики ОКИ. Однако следует отметить, что кампилобактериозный диагностикум для проведения реакции коаггутинации является поливалентным и содержит специфические антитела к антигенам наиболее распространенных видов кампилобактеров (*C.jejuni*, *C.coli*, *C.laridis*). Следовательно, положительный результат РКА констатирует лишь наличие в исследуемом копрофильtrate антигенов *Campylobacter* spp. без видовой принадлежности кампилобактеров. Кроме того, без выделения чистой культуры возбудителя невозможно определение антибиотикочувствительности. В этом возможности РКА на данный момент уступают потенциалу бактериологического метода.

## ВЫВОДЫ

1. Внедрение обязательного и своевременного бактериологического исследования на кампилобактеры при лабораторной диагностике ОКИ позволило установить, что кампилобактериоз занимает одно из ведущих мест среди острых кишечных инфекций в Липецкой области наряду с шигеллезом и сальмонеллезом. Установлено, что группу повышенного риска заболеваемости кампилобактериозом в Липецкой области составляют дети ( $82,6 \pm 2,7\%$  от всех заболевших), особенно дети до 2 лет ( $66,2 \pm 3,4\%$  от всех заболевших).
2. Помесячная динамика заболеваемости кампилобактериозом коррелирует с летним подъемом заболеваемости ОКИ, пик выделения возбудителя приходится на летне - осенний период с июня по сентябрь - 61 % всех выделенных штаммов кампилобактеров.
3. Анализ антибиотикочувствительности штаммов кампилобактеров, выделенных в Липецкой области, показал высокий уровень резистентности данных микроорганизмов к цефалексину ( $100 \pm 0,0\%$ ); цефазолину ( $96,8 \pm 1,6\%$ ) и их чувствительности к имипенему ( $100 \pm 0,0\%$ ), цефепиму ( $100 \pm 0,0\%$ ) хлорамфениколу ( $98,7 \pm 0,9\%$ ), офлоксацину ( $89,4 \pm 2,4\%$ ), эритромицину ( $85,6 \pm 2,8\%$ ). Показатель резистентности к

эритромицину, рекомендуемому рядом авторов как препарат выбора при кампилобактериозе, составляет  $3,8 \pm 1,5\%$ .

4. Обнаружение штаммов, устойчивых к налидиксовой кислоте ( $10,9 \pm 2,5\%$ ), является “тревожным сигналом”, так как чувствительность к налидиксовой кислоте используется в традиционном алгоритме идентификации кампилобактеров.
5. Использование реакции коагутинации в общей схеме лабораторной диагностики кампилобактериоза показало ее высокую информативность и перспективность в качестве сигнального скрининг-экспресс-метода ( $12,6 \pm 1,16\%$ ) обнаружения антигенов кампилобактеров по сравнению с бактериологическим методом ( $2,33 \pm 0,5\%$ ).

### **Практические рекомендации**

1. Для повышения эффективности исследований на кампилобактеры предложено применение:
  - латексных агглютинационных наборов с целью первичной индикации кампилобактериозной культуры;
  - современных диагностических систем для видовой идентификации, позволяющих одномоментное проведение комбинации ферментативных и ассимиляционных тестов, включая чувствительность к антибиотикам;
  - питательной среды Мюллера - Хинтона с 5% эритроцитарной массы и 0,2% хлорида магния для определения чувствительности кампилобактеров к антибиотикам.
2. Целесообразно применение скрининговых экспресс - методов диагностики кампилобактериоза (РКА, ИФА) совместно с классическим культивированием кампилобактеров на питательных средах как взаимодополняющих методов.

## **СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Мищук В.И., Гритчина А.В., Иванова О.В. Бактериологическая диагностика кампилобактериоза // Материалы Межрегиональной НПК “Актуальные проблемы формирования здорового образа жизни и охраны здоровья населения”- Липецк, 2003. – С. 86– 87.
2. Гритчина А.В., Иванова О.В., Мищук В.И. Анализ антибиотикорезистентности штаммов кампилобактерий // Медицинская микробиология - XXI век. Материалы Всероссийской научно-практической конференции (28-30 сентября 2004г., Саратов). – 2004. – С. 71 – 72.
3. Гритчина А.В., Иванова О.В., Мищук В.И. Мониторинг антибиотикорезистентности кампилобактеров // Тезисы докладов Российской научно-практической конференции с международным участием “Роль клинической микробиологии в профилактике внутрибольничных инфекций”- 26–27 октября 2004 г.- М., 2004. – С.34.
4. Бандина О.Н., Мищук В.И., Гритчина А.В., Андреева О.Н. Этиологическая структура ОКИ в Липецкой области. // Материалы 18 Межрегиональной НПК “Актуальные вопросы повышения эффективности здравоохранения”- Липецк, 2005. – С. 428 – 429.
5. Мищук В.И., Гритчина А.В., Пожалостина Л.В. Роль бактериологических исследований в расшифровке этиологической структуры острых кишечных инфекций в Липецкой области // Клин. лаб. диагностика. – 2005. - №9. – С. 54 – 55.
6. Мищук В.И., Гритчина А.В., Иванова О.В. Бактериологическая диагностика кампилобактериоза. Методические рекомендации // Липецк, 2005. – 18 с.
7. Прудникова В.Д., Александрова В.В., Токарева Л.А., Гритчина А.В., Иванова О.В. Клинико-лабораторная характеристика кампилобактериоза в Липецкой области. // Материалы 18 Межрегиональной НПК “Актуальные вопросы повышения эффективности здравоохранения”- Липецк, 2005. – С. 429 – 432.

### **Благодарности.**

Выражаю искреннюю благодарность за сотрудничество и оказанную помощь в работе и консультации Герман К.М. – главному врачу клинической

инфекционной больницы г. Липецка, Мищук В.И.- зав.бактериологической лабораторией, врачам-бактериологам Ивановой О.В. и Андреевой О.И., Александровой В.В.- зав.детским отделением кишечных инфекций, врачам-инфекционистам Прудниковой В.Д., и Токаревой Л.А.