

УДК 616.- 07:314.422.22

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛЕТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ У МАЛОВЕСНЫХ ДЕТЕЙ

О.В.Островская,¹ О.В. Кожарская,² Н.М. Ивахнишина¹, Е.Б. Наговицына,¹ М.А. Власова,¹ С.Л. Бачалдин², В.Г.Обухова², Д.В. Мусатов²

¹Хабаровский филиал ДНЦ ФПД - Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства,

²Перинатальный центр Министерства здравоохранения Хабаровского края

Методом ПЦР проведена этиологическая верификация летальных инфекций у маловесных детей. Исследованы пробы плаценты и органов детей, погибших в ранний неонатальный период, в неонатальный и постнатальный периоды. Аутопсийный материал от детей, умерших в ранний неонатальный период, был инфицирован в 100% случаев возбудителями инфекций, колонизирующих генитальный тракт женщин (*Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus pneumoniae*). При гибели детей в более позднем периоде в аутопсийном материале в 66,7% случаев установлены моноинфекции (*Mycoplasma hominis*, *Streptococcus pneumoniae*) и ассоциации микроорганизмов, преимущественно - микоплазм с вирусами, кокковой, бациллярной микрофлорой и грибами.

Ключевые слова: недоношенные дети, летальные инфекции, ПЦР

EXPERIENCE IN USING POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DIAGNOSIS OF LETHAL INFECTIONS IN LOW-WEIGHT CHILDREN

O.V.Ostrovskaya¹, O.V.Kozharskaya², N.M. Ivakhnishina¹, E.B. Nagovitsyna¹, M.A.Vlasova¹, S.L. Bachaldin², V.G. Obukhova², D.V. Musatov²

¹Research Institute of Mother and Child Health Care, Khabarovsk – Khabarovsk Branch of the Far-Eastern Research Center of Respiratory Physiology and Pathology,

²Perinatal Center, Khabarovsk Krai Ministry of Health

Etiological verification of lethal infections in low-birth-weight children by a PCR method was reported. Specimens of placenta and internal organs of children who died in an early neonatal (5 cases), neonatal and postnatal periods (15 cases) were examined. Autopsy material of children died during early neonatal period was 100% infected by the pathogens colonizing female genital tract (*Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus pneumoniae*). Autopsy material in 66.7% of cases, died in later period, had monoinfections (*Mycoplasma hominis*, *Streptococcus pneumoniae*) and was mainly associated mycoplasma and viruses, coccal, bacillary microflora, and fungi.

Key words: premature children, lethal infections, PCR.

Актуальность

Одной из ведущих проблем современного акушерства и перинатологии являются внутриутробные инфекции (ВУИ), которые вызываются различными возбудителями, но характеризуются сходными эпидемиологическими и клиническими показателями. В соответствии с периодом развития клинических симптомов ВУИ подразделяют на врожденные, при которых инфицирование и развитие болезни происходит внутриутробно, и перинатальные, при которых инфицирование плода осуществляется незадолго до родов или во время родов при нарушенном биоценозе родовых путей. А в клинической практике инфекционно-воспалительные заболевания новорожденных подразделяют на врожденные (диагностируются в раннем неонатальном периоде до 7 дней жизни) и постнатальные (приобретенные после рождения).

Этиологическая структура инфекционно-воспалительных заболеваний у новорожденных зависит от путей передачи, срока гестации и других факторов. Как ВУИ рассматриваются все те инфекции, которые могут передаваться вертикально и приводят к развитию инфекционно-воспалительных процессов у плода и новорожденного: краснуха, сифилис, гонорея, туберкулёз, герпес-вирусные инфекции, вирусные гепатиты, листериоз, хламидиоз, микоплазмоз, инфекции, вызванные вирусом иммунодефицита человека, энтеровирусы, микроорганизмы условно-патогенной группы.

ВУИ занимают одно из ведущих мест среди причин перинатальной и младенческой заболеваемости и смертности [10]. Перинатальная смертность недоношенных детей в 6-10 раз выше, чем смертность новорожденных с нормальной массой тела. Среди умерших на первом году жизни недоношенные дети составляют 55-65%, в основном за счет детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела [4, 9].

Классические способы этиологической верификации при перинатальной и младенческой смертности трудоемки, дорогостоящи и занимают длительное время. На результаты диагностики значительно влияет предварительная эмпирическая антибиотикотерапия. Этих недостатков лишены методы молекулярной диагностики, позволяющие осуществлять прямую детекцию возбудителей в клиническом образце. Нами совместно с сотрудниками ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора разработан способ выявления возбудителей внутриутробных инфекций в аутопсийном материале от погибших плодов и новорожденных с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [7].

Цель исследования – определить инфицированность плаценты и внутренних органов умерших недоношенных детей с использованием ПЦР.

Материалы и методы

С помощью ПЦР исследовали аутопсийный материал 20 случаев смерти недоношенных детей, в том числе 5-ти, умерших в раннем неонатальном периоде до 7 суток жизни (1-я группа) и 15 случаев смерти в неонатальном и постнеонатальном периоде, дети прожили от 10 суток до 2 месяцев жизни (2-ая группа). Изучали пробы головного мозга, сердца, легких, почек, печени, селезенки и плаценты. Определяли геном следующих возбудителей: *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* (*M. hom.*), *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* (*Ur. ur.*), *Cytomegalovirus* (*CMV*), *Herpes simplex virus*, *Herpes human virus 4 type*, *Herpes human virus 6 type*, *Enteroviruses*, *Rubella*, *Parvovirus B19*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pn.*), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps. aer.*), *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pn.*), *Haemophilus influenzae* (*H. inf.*), *Candida albicans* (*Cand. alb.*), *Aspergillus fumigatus* (*Asp. fum.*). Работу осу-

ществляли с помощью набора реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора [7].

По протоколам патологоанатомического описания проведен ретроспективный анализ анамнестических данных, течения беременности и перинатальных исходов в исследуемых группах.

Результаты и обсуждение

Возраст беременных женщин находился в пределах от 21 до 35 лет. Впервые беременность наступила только у одной женщины после бесплодия с помощью ЭКО. У остальных зарегистрировано от 2 до 13 беременностей. Большинство пациенток имели отягощенный акушерско-гинекологический анамнез: уреаплазмоз, хламидиоз, трихомониаз выявлены у 30,0% женщин, воспалительные гинекологические заболевания (аднексит, вагинит) диагностированы у 15%. Спонтанные выкидыши и искусственные аборты предшествовали настоящей беременности в 45% случаев. Беременность протекала на фоне ожирения и тиреоидита у 5% женщин, обострение пиелонефрита установили у 10% женщин. Плацентарная недостаточность отмечена у 85,0%. Гестоз выявлен у 30% пациенток, угроза невынашивания – у 40%, внутриутробная гипоксия плода - в 15% случаев. Роды развивались с преждевременным излитием околоплодных вод у 30 % женщин. В 1-ой группе роды произошли на 26-29 неделе гестации. Масса тела детей при рождении варьировала от 960г до 1590г. (средняя масса тела 1233 г). Во 2-ой группе беременность завершилась на 26-33 неделе. Масса тела при рождении составила от 860 до 2205 г. (средняя масса тела 1479 г).

Морфологическое исследование плацент выявило признаки хронической плацентарной недостаточности (50,0%), воспалительные изменения - 85,0%, инволюционно-дистрофические изменения – 25,0%, пороки развития плаценты, отрицательно влияющие на плод, течение беременности и родов (плаценту, окруженную валиком, краевое прикрепление пуповины) - 25%. Преждевременную отслойку плаценты установили в 20,0% случаев, нарушения кровообращения – в 20,0%, нарушения водно-солевого обмена - в 15,0%.

Основной причиной смерти по результатам патологоанатомического заключения в 1-ой группе стали: синдром дыхательных расстройств и аспирационная пневмония (1), синдром дыхательных расстройств и внутрижелудочковое кровоотечение (1), генерализованная внутриутробная инфекция с вовлечением 2-5 органов (3). Во 2-ой группе бронхопневмония стала основной причиной смерти в 5 случаях, внутриутробная инфекция в генерализованной форме – в 4-х, неонатальный сепсис – в 3-х, некротически-язвенный колит – в 3-х. В большинстве случаев детекция инфекционных агентов давала положительный результат во всех исследуемых органах и в плаценте.

Молекулярно-генетические исследования выявили возбудителей инфекций в образцах органов 15 погибших детей (75% от числа исследованных), в том числе моноинфекции - в 6 случаях (30%) и смешанные инфекции - в 9 (45%) (табл.1). Образцы органов умерших детей 1-ой группы, проживших до 7 дней жизни, были инфицированы в 100% случаев. В том числе *U. urealyticum* (у 4 из 5 обследованных), *M. hominis* (2) и *S. pneumoniae* (3). Эти инфекционные агенты колонизируют генитальный тракт женщин и попадают в плаценту и плод восходящим путём или при прохождении через родовые пути. В предыдущих наших работах показано, что *U. urealyticum* определяется в генитальных мазках у 40,0-54,7% женщин репродуктивного возраста г. Хабаровска, *M. hominis* у -15,1-37,2%, [6], *Streptococcus sp* – у 7,1-9,1% [1]. Можно предположить, что эти возбудители вызвали врожденную инфекцию у детей 1-ой группы.

Таблица 1.

Спектр инфекционных агентов, выявленных в аутопсийном материале при гибели недоношенных детей методом ПЦР

Пробы органов умерших недоношенных детей	
1 группа – дети прожили до 7 дней n = 5	2 группа - дети прожили от 8 дней до 2 мес. n = 15
Моноинфекции 6 / 30%	
S.pn - 1 Ur.ur.- 2	M.hom. – 2 S.pn – 1
Смешанные инфекции 9 / 45%	
M.hom. + Ur.ur.+ S.pn. - 2	Ur.ur. + S.pn. – 2 Ur.ur. + S.pn. + CMV + Cand. alb. – 1 Ur.ur. + Adeno + H.inf – 1 Ur.ur. + M.hom. – 1 Adeno + S.pn. + Asp.fum. – 1 P. aer. + K.pn. - 1
Всего инфицировано	
5 / 100%	10 / 66,7%

Во 2-ой группе оказались инфицированными органы 66,7% исследованных погибших детей. Наряду с микоплазмами (8) и пневмококком (5) во 2-ой группе в единичных случаях определены *Cytomegalovirus*, аденовирусы, грибы (*Cand.alb.*, *Asp.fum.*), возбудители нозокомиальных инфекций (*Ps.aer.*, *Kl.pn.*), гемофильная палочка (*H.inf.*).

В 30% наблюдений результаты ПЦР оказались отрицательными в отношении исследованных инфекций. Не было установлено таких возбудителей, как *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Herpes simplex virus*, *Herpes human virus 4 type*, *Herpes human virus 6 type*, *Enteroviruses*, *Rubella*, *Parvovirus B19*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*.

В случаях идентификации микоплазм в органах погибших детей в плаценте, как правило, определяли продуктивный лейкоцитарный плацентит, незрелость ворсин, хроническую плацентарную недостаточность, гипоксию плода, врожденные аномалии развития - краевое прикрепление плаценты. Так, мальчик К. родился на 27-ой неделе беременности с массой тела 995 г. Матери 30 лет, первородящая. В анамнезе – вагинит. Беременность развивалась с истмико-цервикальной недостаточностью, угрозой невынашивания на 22 неделе, хронической гипоксией плода. В плаценте установлен продуктивный лейкоцитарный плацентит, незрелость ворсин, порок развития плаценты - краевое прикрепление пуповины. При рождении у ребенка отмечено первичное нерасправление легких и внутрижелудочковое кровоизлияние, обусловленное гипоксией. Крупноочаговая эмфизема легких осложнилась пневмотораксом. Причиной смерти на 2-ой день жизни стала легочно-сердечная недостаточность. В плаценте, головном мозге, легком и печени была выявлена *U.urealyticum*.

Участие *U.urealyticum* в развитии преждевременных родов, инфекционных осложнений раннего неонатального периода, рождения детей с малой массой тела дискутируется. Количественная оценка концентрации микоплазм - общепринятая граница 10^4 ГЭ/мл - не выявляет связи с развитием патологии беременности, родов и неонатального периода [3]. Наши исследования показывают, что нельзя исключить влияния микоплазм, а также их ассоциаций с другими возбудителями, на развитие воспалительных изменений в плаценте, а, следовательно, и на исходы беременности.

В 2-х случаях в образцах всех органов погибших детей выявлен *S. pneumoniae*. Один из них - мальчик Л., родился преждевременно на 31 неделе беременности с массой тела 1235г. Матери 23 года, соматический статус без особенностей. Беременность 2-ая, первая завершилась самопроизвольным выкидышем. Настоящая беременность протекала с угрозой невынашивания, хронической плацентарной недостаточностью. Ребенок родился с задержкой внутриутробного развития, иммунно-эндокринной недостаточностью, внутрижелудочковым кровоизлиянием. Гистологическое исследование плаценты выявило врожденный порок – краевое прикрепление пуповины, лейкоцитарный хорио-амнионит, хроническую плацентарную недостаточность. На этом фоне развился неонатальный сепсис. Заболевание проявилось гнойным менингоэнцефалитом, гнойным венкулитом, абсцедирующей пневмонией, гнойным нефритом, панкреатитом и гепатитом. Ребенок прожил 2 месяца. Можно рассматривать этот случай как постнатальное заражение *S.pneumoniae* недоношенного ребенка, постнатальный неонатальный сепсис. Частота развития неонатального сепсиса колеблется от 0,5 до 15 случаев на 1000 живорожденных [12]. В настоящее время показана важная роль стрептококка группы В (СГВ) в этиологии инфекционно-воспалительных заболеваний новорожденных [2], разработаны руководства по профилактике этой инфекции [5, 11]. В то же время частота носительства *S.pneumoniae* в урогенитальном тракте женщин репродуктивного возраста, риск колонизации новорожденных детей, частота неонатального сепсиса, вызванного *S. pneumoniae* не изучены. Эти факты диктуют необходимость продолжения исследований.

Pseudomonas aeruginosa и *Klebsiella pneumoniae* широко распространены повсеместно, входят в состав нормальной микрофлоры человека, часто инфицируют медицинское оборудование, циркулируют среди персонала и пациентов. Эти бактерии считаются основными возбудителями нозокомиальных инфекций [8]. *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* могут быть причиной разнообразных патологических состояний у новорожденных, включая сепсис, некротизирующий энтероколит, пневмонию, менингит, диарею, конъюнктивит, инфекции мочевыводящих путей и кожи. Риск развития нозокомиальных инфекций увеличивается при наличии выраженной недоношенности, врожденной патологии неинфекционного происхождения, большого числа манипуляций, искусственной вентиляции легких, инфузионной терапии, кормлении через зонд за счет нарушения целостности слизистых оболочек и создания путей для проникновения инфекции в кровяное русло.

Следующий пример иллюстрирует вышеизложенное. Мальчик Ю. родился на 32 неделе беременности с массой тела 1300г. Второй ребенок из монохориальной диамниотической двойни. Матери 35 лет. Настоящая беременность 3-ая. Первая завершилась нормальными срочными родами, вторая - спонтанным выкидышем. Во 2-ой половине настоящей беременности установлен синдром задержки развития плода, гипоксия плода. По этому поводу сделана плановая операция кесарева сечения. Состояние ребенка при рождении тяжелое с оценкой по шкале Апгар 3-7 баллов, дыхательной недостаточностью на фоне незрелости, недоношенности. С 1-ого дня жизни проводи-

лась терапия с применением катетеризации вен, с 5-ого дня - искусственная вентиляция легких, другие хирургические манипуляции, с 8-ого дня развился некротический энтероколит. Ребенок прожил 21 день. Основная причина смерти – некротический энтероколит 3 степени. Заболевание осложнилось дистрофией паренхиматозных органов, мелкоочаговой пневмонией. В плаценте обнаружили признаки гипоплазии с диссоциированным созреванием ворсин, хроническую недостаточность, острое нарушение маточно-плацентарного кровообращения. В пробах плаценты, головного мозга, легких, печени и почек выявлены ДНК *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*.

В остальных случаях (45% инфицированных) установлены ассоциации микроорганизмов преимущественно - микоплазм с вирусами, кокковой, бациллярной микрофлорой и грибами. Они вызывали тяжелые заболевания с неспецифической морфологической картиной.

Выводы

Методом ПЦР проведена этиологическая верификация летальных инфекций у маловесных детей. Аутопсийный материал от детей, умерших в ранний неонатальный период, был инфицирован в 100% случаев возбудителями инфекций, колонизирующих генитальный тракт женщин (*Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus pneumoniae*). При гибели детей в более позднем периоде в аутопсийном материале в 66,7% случаев установлены моноинфекции (*Mycoplasma hominis*, *Streptococcus pneumoniae*) и ассоциации микроорганизмов, преимущественно - микоплазм с вирусами, кокковой, бациллярной микрофлорой и грибами.

В большинстве случаев клинические и патоморфологические проявления внутриутробных и постнатальных инфекций не патогномичны. Это дает основание рекомендовать метод ПЦР как быстрый, высокочувствительный и высокоспецифичный метод, позволяющий идентифицировать широкий спектр инфекционных агентов, в том числе трудно культивируемых, для этиологической верификации летальных инфекций при перинатальной смертности.

Литература

1. Власова М.А., Островская О.В., Супрун С.В., Кондрашова Е.А., Ивахнишина Н.М., Наговицына Е.Б., Хорук В.В. Оценка состояния микробиоценоза генитального тракта у беременных женщин с преждевременным разрывом околоплодных оболочек с применением теста «Фемофлор» // «Бюллетень физиологии и патологии дыхания». - Благовещенск. - 2014г. - №54. - С. 92-96.
2. Зубков В.В., Рюмина И.И., Тютюнник В.А., Кан Н.Е. Профилактика и лечение инфекционно-воспалительных заболеваний у новорожденных, вызванных стрептококком группы В // Акушерство и гинекология. – 2013. - №6. - С.28 -33.
3. Иванова Т.А., Гущин А.Е., Белова А.В. и соавт. Ассоциация генитальных микоплазм с развитием осложнений в родах и раннем неонатальном периоде // «Молекулярная диагностика-2010». - Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. - Москва, 2010. - том III. - С.335-338
4. Кулаков В.И., Мурашко Л.Е. Преждевременные роды. - М.: Медицина, 2002. - С. 176-178.
5. Министерство здравоохранения и медицинской промышленности Российской Федерации. Санкт-Петербургская Государственная Медицинская Академия им. Мечникова. Эпидемиология и профилактика заболеваний, вызываемых стрептококком группы В, у новорожденных: Инф. письмо. - СПб. - 1999. - 30 с.
6. Островская О.В. Внутриутробные инфекции, клинико-морфологическая оценка современной специфической диагностики: Автореферат ... дис. докт. мед. наук. - Хабаровск, 2009. – 44 с.
7. Островская О.В., Ивахнишина Н.М., Власова М.А. и соавт. Способ выявления возбудителей внутриутробных инфекций в аутопсийном материале от погибших плодов и новорожденных: Методические рекомендации. - Хабаровск: - 2012. – 22 с.
8. Телятинский Н.И., Абаев Ю.К. Нозокомиальная инфекция у новорожденных детей // Медицинский журнал. - 2010. - №2. - С. 27-32.
9. Abbot Lupton R. Admission Temperature of Low Birth Weight infants: Predictors and Associated Morbidities // Pediatrics. - 2007. - №1. – P. 119-123.
10. Blencowe H., Cousens S., Oestergaard M.Z. et al. National, regional and worldwide estimates of pre-term birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications // The Lancet. - 2012. – V.379. - P.2162-2172.
11. Regan J.A., Klebanoff M.A., Nugent R.P. et al. Colonization with group B streptococci in pregnancy adverse outcome. VIP Study Group // Am. J. Obstet. Gynecol. - 1996. - V. 174(4). – P. 1354-1360.
12. Ho M.Y., Wu C.T., Huang F. Y., Peng C.C. Group B streptococcal infections in neonates: an 11-year review // Acta Paediatr. - Taiwan. - 1999. - V. 40(2). - P. 83-86

Сведения об авторах

Островская Ольга Васильевна - д.м.н., ведущий научный сотрудник, руководитель группы молекулярно-генетической диагностики лаборатории комплексных методов исследования бронхо-легочной и перинатальной патологии Хабаровского филиала ДНЦ ФПД - НИИ ОМиД, E-mail: iomid@yandex.ru

Кожарская Ольга Валерьевна – врач-патологоанатом высшей категории, заведующая патолого-анатомическим отделением КГБУЗ «Перинатальный центр» МЗ Хабаровского края, E-mail: prinalat-center@rambler.ru

Ивахнишина Наталья Михайловна – к.б.н., старший научный сотрудник группы молекулярно-генетической диагностики лаборатории комплексных методов исследования бронхо-легочной и перинатальной патологии Хабаровского филиала ДНЦ ФПД - НИИ ОМиД, E-mail: iomid@yandex.ru
