

УДК: 616.98:579.862.1Streptococcus:616.211/.216-07

ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИ РИНОСИНУСИТАХ

В.А. Шмыленко¹, А.П. Бондаренко¹, О.Е.Троценко¹, Д.Е. Смышляев²¹ФБУН «Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Хабаровск, Россия;²Дальневосточный центр эндоскопической ринологии, г. Хабаровск, Россия

Изучена возможность экспресс-диагностики пневмококковой инфекции при риносинусите на основе применения иммунохроматографического метода (ИХМ) Binax NOW (Alere, Inc., США) для выявления антигена *Streptococcus pneumoniae* непосредственно в клинических образцах. Особенность методики заключалась в получении материала для исследования из глубоких отделов носоглотки (аспирата) с помощью электроотсоса. Диагностические способности теста Binax NOW в 100 пробах клинического материала путём сравнительных испытаний с классическим бактериологическим методом. Пневмококк бактериологическим методом был выделен у 16 больных (16±3,7%). Антиген пневмококка ИХМ выявлен в 20 случаях (20±4,0%). Показатель чувствительности ИХМ составил 87,5%, специфичности – 92,9%, что позволяет рекомендовать ИХМ для диагностики пневмококковой инфекции при синуситах в клинической практике. Преимуществами данного приёма стали получение быстрого результата исследования (в течение 15 минут) и возможность применения неинвазивного способа забора клинических образцов.

Ключевые слова: риносинусит, пневмококковая инфекция, экспресс-диагностика, иммунохроматографический тест Binax NOW, носоглоточный аспират

RAPID DIAGNOSIS OF PNEUMOCOCCAL INFECTION IN RHINOSINUSITIS

V.A. Shmylenko¹, A. P. Bondarenko¹, O. E. Trotsenko¹, D.E. Smishlyaev²¹FBIS Khabarovsk research institute of epidemiology and microbiology of the Federal service for surveillance on consumers rights protection and human wellbeing (Rospotrebnadzor), Khabarovsk, Russia;²Far Eastern center of endoscopic rhinology, Khabarovsk, Russia

The research included evaluation of express-diagnosis capability of immunochromatographic assay (ICA) Binax NOW (Alere, Inc., США) for diagnosis of the rhinosinusitis caused by to detect the *Streptococcus pneumoniae* antigen directly in clinical samples. The unique feature of the method included obtaining samples with an electric suction machine in order to evaluate aspirate from deep parts of the nasal cavity. Diagnostic capability of the Binax NOW was determined in a comparative study using classical bacteriological method in 100 clinical samples. *Pneumococcus* was isolated in 16 patients (16±3,7%) via bacteriological method. ICA utilization allowed to reveal pneumococcal antigen in 20 cases (20±4,0%). ICA test sensitivity equaled 87,5%, specificity – 92,9%. Obtained results allow us to recommend ICA for identification of pneumococcal infection in patients with sinusitis for practicing physicians. The advantages of the evaluated method were fast results (for up to 15 min) and possibility of non-invasive sampling technique of clinical specimens.

Key words: rhinosinusitis, pneumococcal infection, express-diagnosis, immunochromatographic assay Binax NOW, nasopharyngeal aspirate

Термин «риносинусит» объединяет группу воспалительных заболеваний полости носа и околоносовых пазух. Актуальность проблемы острого риносинусита (ОРС) обусловлена не только широкой распространённостью этого заболевания, но и склонностью его к рецидивирующему течению, а также к развитию серьёзных осложнений [4,11]. Осложнения острого бактериального риносинусита (ОБРС) в целом встречаются относительно редко, однако, в большинстве своём, отличаются тяжёлым течением. Осложнения могут быть следствием как прямой, так и гематогенной диссеминации инфекции и включают следующие позиции: инфекции глазницы и периорбитальной области, внутричерепные абсцессы, тромбоз кавернозного синуса, менингит, сепсис [3].

В настоящее время серьёзной проблемой клинической практики является разграничение вирусного и бактериального ОРС. Данное разграничение необходимо для выбора правильной тактики лечения, снижения частоты необоснованного применения антимикробных препаратов и связанного с

этим риска хронизации процесса, а также для предотвращения развития и распространения антибиотикорезистентности возбудителя. В современной отечественной литературе ОБРС встречается в 2-10% случаев, и это особенно важно учитывать при выборе адекватного этиотропного лечения с назначением противовирусной или системной антибактериальной терапии [5].

По данным многочисленных исследований, основным возбудителем бактериального ОРС является *Streptococcus pneumoniae*, реже *Haemophilus influenzae* и *Moraxella catarrhalis* [7, 3, 4]. Поражение слизистых оболочек носа *S. pneumoniae*, по сведениям зарубежных авторов, составляет от 40 до 60% всей бактериальной патологии, причем в патологический процесс вовлекается более одной околоносовой пазухи [14, 15].

«Золотым стандартом» этиологической диагностики ОБРС является классический бактериологический метод: выделение бактерий в высокой концентрации (более 10^4 КОЕ/мл) из материала, полученного при пункции синуса пациента с подозрением на ОБРС. Однако пункция ОНП – инвазивная и достаточно травматичная манипуляция, которая должна проводиться по строгим показаниям [3]. Существенным отрицательным моментом классического бактериологического метода является трудоёмкость и продолжительность микробиологического исследования – 48-72 часа с момента получения материала. При этом широкое распространение практики применения антибактериальных препаратов заболевшими до обращения за медицинской помощью значительно снижает результативность бактериологического метода [7]. Следует учесть, что мазки из среднего носового хода, применяемые для исследования микрофлоры носа, не пригодны для микробиологической диагностики синусита, т.к. всегда контаминированы микрофлорой полости носа, которая не всегда соответствует микрофлоре пазухи [11].

В последние годы всё большую популярность приобретают иммунохроматографические методы (ИХМ) – экспресс-тесты выявления различных инфекций. Иммунохроматографический тест (ИХТ) Binax NOW *S. pneumoniae* производства Alere Scarborough, Inc., США был разработан для обнаружения растворимого антигена *S. pneumoniae* в моче при пневмониях и в спинномозговой жидкости при менингитах. Тест-карта Binax NOW представляет собой кассету в форме открывающейся книжки, содержащую на одной стороне тест-полоску, а на противоположной стороне от тест-полоски лунку для внесения тампона с исследуемым в тесте образцом. Исследуемый образец на тампоне устанавливают в лунку и смачивают буферным раствором А для создания капиллярного потока, кассету закрывают. При тестировании содержащийся в исследуемом образце антиген *S. pneumoniae* связывается с находящимися на подложке антителами окрашенного конъюгата, и этот окрашенный комплекс антиген-конъюгат связывается за счёт наличия антигена с иммобилизованными на мембране кроличьими антителами к антигену *S. pneumoniae*, формируя окрашенную линию в зоне чтения результата. Иммобилизованные на контрольной полоске в виде линии козы антитела против IgG кролика также связывают окрашенный конъюгат, формируя контрольную окрашенную линию [8]. Выполнение исследования занимает 10-15 минут, полученный результат позволяет своевременно и целенаправленно проводить специфическую антибактериальную терапию и избегать многочисленных осложнений.

Цель исследования: определить возможность выполнения экспресс-диагностики пневмококковой инфекции при риносинуситах на основе применения ИХТ Binax NOW.

Материалы и методы

Забор носоглоточного секрета осуществлялся во время эндоскопического обследования пациентов методом, разработанным врачом отоларингологом Д.Е. Смышляевым [2]. Методика заключается в следующем: эндоскоп вводят в полость носа на глубину 7-15 см после предварительной анестезии носовых ходов 10% раствором лидокаина. После эндоскопического осмотра при необходимости исследования проводят забор материала. Для этого одновременно с эндоскопом или отдельно от него в полость носа на ту же глубину вводят одноразовый стерильный подключичный катетер. С наружной стороны к катетеру присоединяют электроотсос и отсасывают слизь из носоглотки. Затем катетер, заполненный слизью, удаляют из полости носа и к наружному концу катетера подсоединяют стерильный одноразовый шприц, содержащий 2 мл стерильного физиологического раствора. Нажимая на поршень шприца, промывают катетер физиологическим раствором, одновременно выдвигая аспират в стерильную пробирку. Полученные пробы готовы для исследования.

Известно, что гибко-волоконная эндоскопия даёт возможность визуализировать средний носовой ход, а культуральное исследование аспирата хорошо коррелирует с возбудителями, полученными при пункции верхнечелюстного синуса [3].

Полученный аспират от 100 пациентов исследовали параллельно классическим бактериологическим методом и экспресс – методом. Критериями включения больных в исследования явились: наличие у пациентов характерных клинических признаков и объективных данных эндоскопического осмотра.

При бактериологическом исследовании посев аспирата проводили тампоном на оптимальный для выделения пневмотропных микроорганизмов набор питательных сред (кровяной агар (КА) с добавлением 3,5% лошадиной сыворотки и 5% эритроцитов барана, шоколадный агар, желточно-солевой агар, среда Эндо, среда Сабуро, сахарный бульон). Использовали метод «растяжки» посева

ного материала с площадки на чашках Петри с КА, добиваясь разреженного роста изолированных колоний. Посевы на КА и шоколадном агаре выращивали в CO₂ инкубаторе. Выросшие микроорганизмы идентифицировали с использованием бактериологического анализатора Vitec 2 Compact.

Для выполнения экспресс - теста использовали тест – карту Binax NOW *S. pneumoniae*. Стерильный тампон на палочке из набора тест - системы Binax NOW погружали в подготовленный секрет, находящийся в пластиковой пробирке. Затем вынимали тампон, помещали в тест-кассету, добавляя 3 капли реагента А (цитратно-фосфатного буфера с лаурил-сульфатом, Твином-20 и азидом натрия) из прилагающейся пластиковой капельницы. Устройство закрывали для создания капиллярного потока, чтобы привести исследуемый образец в контакт с тест-полоской. Положительный результат регистрировали через 10-15 минут по наличию двух окрашенных линий (опыт и контроль) от розового до пурпурного цвета в зоне чтения теста. На отрицательный результат указывает одна окрашенная контрольная линия, свидетельствуя о том, что тест выполнен надлежащим образом, но антиген *S. pneumoniae* в тестируемом образце не обнаружен.

Для установления достоверности скринингового теста рассчитывали показатели чувствительности, специфичности, точности, прогностичности положительного результата и прогностичности отрицательного результата. Проводился расчёт удельного веса (М, %) выделенных в ходе исследования возбудителей, и ошибки средней (m) с использованием программы Excel.

Результаты и обсуждение

Для обоснования использования иммунохроматографической коммерческой тест-системы Binax NOW производства Alere Scarborough, Inc., США с целью экспресс- диагностики пневмококковой инфекции при риносинуситах проведена оценка скринингового теста системы Binax NOW для верификации возбудителя в носоглоточном секрете пациентов. При этом результаты исследования сравнивали с результатами классического бактериологического метода.

С целью определения диагностической способности теста Binax NOW параллельно двумя методами было проведено исследование 100 проб носоглоточного аспирата в целях обнаружения антигена или возбудителя *S. pneumoniae*.

Результаты сравнительного исследования носоглоточных проб от больных риносинуситом классическим бактериологическим методом и иммунохроматографическим методом (ИХМ) представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Результаты сравнительного исследования носоглоточного аспирата больных риносинуситом классическим бактериологическим методом и иммунохроматографическим методом Alere Binax NOW (N=100)

Наименование метода	Всего проб	Выделен <i>S. pneumoniae</i>	Выделены другие возбудители	Бактерии не выделены
Бактериологический метод	100	16	50	34
ИХМ в том числе:	100			
Binax NOW +	20	14	4	2
Binax NOW -	80	2	46	32

Бактериологическим методом пневмококк был выявлен у 16 больных (16±3,7%), в том числе в монокультуре, а также в ассоциации с *Moraxella catarrhalis* и *Haemophilus influenzae*. Пневмококк не выделен в 84 пробах, в том числе в 50 случаях выявлены другие бактериальные возбудители (*M. catarrhalis*, *H. influenzae*, *S. aureus*, *Streptococcus* spp.), в 34 случаях вообще не были обнаружены бактериальные агенты.

Пневмококк иммунохроматографическим методом выявлен в 20 случаях (20±4,0%), в том числе в 14 из 16 проб, подтверждённых классическим методом, в 4 случаях *S. pneumoniae* обнаружен в группе проб «другие бактериальные возбудители» и в 2 случаях - в группе «бактериальные возбудители не выявлены».

Для расчёта достоверности скринингового теста мы использовали два основных критерия информативности (чувствительность и специфичность) и три вспомогательных критерия информативности (прогностичность положительного результата, прогностичность отрицательного результата, точность). Оценку перечисленных показателей осуществляли по методу и формулам, изложенным в учебном пособии В.И. Покровского и Н.И. Брико [9].

Показатель чувствительности экспресс - теста составил 87,5%, специфичности – 92,9%, что практически совпадает с данными (79,3% - чувствительность, 93,3% - специфичность), полученными другими исследователями, проводившими верификацию пневмококковых пневмоний ИХТ Binax NOW при исследовании проб мочи [8,12]. Прогностическая ценность положительного результата ИХМ, указывающая на вероятность того, что пациент на данный момент действительно болен пневмококковой

инфекцией и врач может с большей уверенностью считать, что положительный результат теста подтверждает предполагаемый диагноз, составила в нашем исследовании 70%. Прогностическая ценность отрицательного результата, то есть вероятность того, что при негативном результате теста у пациента отсутствует пневмококковая инфекция – 97,5%. Точность теста (доля правильных результатов) определена в пределах 92%.

На разработанный нами экспресс-метод диагностики риносинуситов пневмококковой этиологии с использованием иммунохроматографического теста Binaх NOW получен патент РФ на изобретение «Способ экспресс-диагностики пневмококковой инфекции при риносинуситах» (№ 2707068 от 22.11.2019 г.).

Дополнительно следует отметить, что достаточно высокие диагностические параметры быстрого метода диагностики *S. pneumoniae* по сравнению с классическим «золотым стандартом» получены при неинвазивном способе забора материала (асpirата) от больных. В современных зарубежных публикациях внимание также акцентировано на том, что для установления бактериологической причины инфицированного синуса необходимо получить образец секрета, не загрязнённого оральной флорой или флорой слизистых оболочек дыхательных путей [13]. Частота носительства *S. pneumoniae* в носоглотке у детей достигает 15-30% случаев [1]. Однако обнаружение пневмококка в носоглотке при заборе проб для исследования тампоном из среднего носового хода не означает этиологическую обусловленность риносинусита.

В наших исследованиях показано, что пневмококк бактериологическим методом был выявлен при риносинусите в 16% случаев, а ИХМ – в 20% случаев. При этом из 16 проб, подтверждённых классическим методом, *S. pneumoniae* ИХМ был выявлен только в 14 пробах, что может свидетельствовать, с одной стороны, о недостаточной чувствительности ИХМ, а с другой стороны, о возможной гипердиагностике возбудителя бактериологическим методом.

В то же время *S. pneumoniae* ИХМ в 6 случаях выявлен «избыточно» по отношению к бактериологическому методу: в 2 случаях - в группе больных с отрицательным бактериологическим результатом, что можно расценивать как проявление более высокой чувствительности экспресс-метода, и в 4 случаях - в группе больных с выделением других бактериальных возбудителей, что может свидетельствовать о возможном наличии перекрёстных результатов. В частности, «избыточный» положительный эффект в наших исследованиях обусловлен наличием в исследуемом аспирате *Streptococcus mitis* и *Streptococcus oralis*, имеющих перекрёстные антигены с *S. pneumoniae*. Нами отмечено, что зачастую эти оптохинотрицательные микроорганизмы выделяются в данном биотопе массивно и в чистой культуре и, возможно, имеют клиническое значение, что требует более глубокого изучения этого феномена. Результаты наших наблюдений подтверждаются и другими исследователями [8].

Заключение

В медицинской диагностике оптимальным методом исследования признаётся тот, который был бы априорно как высоко специфичен, так и высоко чувствителен. Методики диагностики с высокой чувствительностью редко «пропускают» пациентов, у которых имеется болезнь, а методики с высокой специфичностью не относят здоровых к категории больных.

Таким образом, ИХТ Binaх NOW для выявления *S. pneumoniae* в глубоких отделах носоглотки у больных риносинуситом характеризуется высокими критериями информативности, быстрым получением результатов и может быть рекомендован для широкого использования в клинической практике. Высокий процент прогностической ценности отрицательного результата при использовании данного способа диагностики даёт врачу возможность уверенно отвергнуть наличие пневмококковой инфекции у пациента с клиникой острого бактериального синусита.

Литература

1. Баранов А.А., Брико Н.И., Намазова-Баранова Л.С., Ряпис Л.А. Стрептококки и пневмококки. Руководство для врачей. Ростов-на-Дону: Феникс. 2013. 302 с.
2. Бондаренко А.П., Смышляев Д.Е. Риносинуситы. Этиология, опыт бактериологических исследований. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2007; 10 : 100-104.
3. Каманин Е.И., Козлов Р.С., Веселов А.В. Острый бактериальный риносинусит. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2008; 10 (1):43-54.
4. Кривопапов А.А. Риносинусит: классификация, эпидемиология, этиология и лечение. Медицинский совет, 2016; 6: 22-25.
5. Крюков А.И., Туровский А.Б., Карюк Ю.А. Современные подходы к лечению острого бактериального синусита //Медицинский совет, 2013., № 2., с. 8-13.
6. Лопатин А.С. Антибиотикотерапия острых воспалительных заболеваний околоносовых пазух. Consilium medicum. 2003; 5 (4) : 1-8.
7. Лучихин Л.А., Полякова Т.С. Диагностика и лечение острого синусита. РМЖ. 2018; 8(1). Available at https://www.rmj.ru/articles/antibiotiki/Diagnostika_i_lechenie_ostrogo_sinusita/#ixzz5P4Uniuhl
8. Николенко В.В., Фельдблюм И.В., Воробьёва Н.Н., Голоднова С.О., Семериков В.В., Полушкина А.В. и др. Опыт использования иммунохроматографического теста для диагностики пневмококковой пневмонии. Журнал микробиология. 2015 ; 3: 18-24.

9. Покровский В.И., Брико Н.И. Общая эпидемиология с основами доказательной медицины: руководство к практическим занятиям. М.: ГЭОТАР – Медиа; 2012.
10. Рязанцев С.В., Фанта И.В., Павлова С.С. Патогенетическая терапия риносинуситов в практике врача-отоларинголога. Медицинский совет. 2019; 6: 68-73. DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701x-2019-6-68-73>.
11. Свистушкин В.М., Шевчик Е.А. Острый риносинусит – современный взгляд на проблему. РМЖ. 2014; 9 : 643-647.
12. Athlin S, et al. The Binax NOW Streptococcus pneumoniae test applied on nasopharyngeal aspirates to support pneumococcal aetiology in community- acquired pneumoniae. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 2013; 45(6): 425-431.
13. Lorenzo Drago, Lorenzo Pignataro, Sara Torretta Microbiological Aspects of Acute and Chronic Pediatric Rhinosinusitis // J Clin Med., 2019, Vol 8(2): 149. doi: 10.3390/jcm8020149
14. McNally L.M., P.M. Jeena, K. Gajee, A.W. Sturm, A.M. Tomkins, H.M. Coovadia et al. Lack of association between the nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus in HIV-1-infected SouthAfrican children. J. Infect.Dis. 2006 ; 3: 385-390.
15. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper / Weekly Epidemiol. Rec. 2007;Vol. 82:93-104. Available at <https://apps.who.int/iris/handle/10665/240897>

Сведения об ответственном авторе:

Шмыленко Влада Александровна - научный сотрудник лаборатории бактериальных инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, E-mail: baklabhniiem@gmail.com