

© Л.С.Зыкова, А.А.Вялкова, О.В.Бухарин, Э.М.Галлямова, О.В.Мотыженкова, О.К.Любимова, 2012
УДК 616.61-022.7-053.32

*Л.С. Зыкова¹, А.А. Вялкова¹, О.В. Бухарин², Э.М. Галлямова¹,
О.В. Мотыженкова¹, О.К. Любимова¹*

ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛИРОВАННОЙ БАКТЕРИУРИИ У ДЕТЕЙ

*L.S. Zykova, A.A. Vyalkova, O.V. Bucharin, E.M. Gallyamova,
O.V. Motyzenkova, O.K. Lubimova*

CHARACTERISTIC OF ISOLATED BACTERIURIA IN CHILDREN

¹Кафедра факультетской педиатрии Оренбургской государственной медицинской академии, ²Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УРО РАМН, г.Оренбург, Россия

РЕФЕРАТ

Инфекция мочевой системы (ИМС) – наиболее распространенная патология детского возраста. Ключевым признаком инфицированности мочевого тракта является бактериурия. Основным лабораторным методом обследования больного с подозрением на ИМС является микробиологический анализ мочи. Определены микробиологические особенности ИМС у детей Оренбургского региона и предложены методы оценки этиологической значимости урофлоры.

Ключевые слова: бактериурия при пиелонефрите, изолированная бактериурия при кишечном дисбактериозе, контаминация мочи, факторы персистенции бактерий, алгоритм диагностики ИМС.

ABSTRACT

Infection of the urinary system (UTI) is the most common abnormality of childhood. A key sign of urinary tract infection is bacteriuria. The main laboratory method of examination of patients with suspected UTI is the microbiological analysis of urine. Microbiological features of UTI in children of the Orenburg region are determined and proposed methods for estimating the etiologic significance urological flora.

Key words: pyelonephritis with bacteriuria, isolated bacteriuria in intestinal dysbiosis, contamination of urine, persistent bacterial factors, the algorithm diagnosis of UTI.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекция мочевой системы (ИМС) – наиболее распространенная патология детского возраста. Ключевым признаком инфицированности мочевого тракта является бактериурия. Основным лабораторным методом обследования больного с подозрением на ИМС является микробиологический анализ мочи. В нефрологической практике нередко возникают трудности при клинической интерпретации синдрома бактериурии у детей. Определены микробиологические особенности ИМС у детей Оренбургского региона и предложены методы оценки этиологической значимости урофлоры. При высеве микрофлоры из мочи необходимо проводить дифференциальный диагноз между активной стадией пиелонефрита, ИМС с изолированной бактериурией, а также контаминацией мочи микроорганизмами, вегетирующими в дистальном отрезке уретры и (или) в периуретральной области [1–4].

Вялкова А.А. 460000, г. Оренбург, ул. Советская, д. 6. Кафедра факультетской педиатрии Оренбургской государственной медицинской академии. Тел.: 8(3532) 57-22-64, моб. тел.: 8(922) 625-88-75, e-mail: repmanms@mail.ru

Бактериурия в сочетании с лейкоцитурией является ключевым лабораторным тестом ИМС. Принадлежность возбудителей ренальной инфекции (пиелонефрита) к условно-патогенной микрофлоре – естественным обитателям кожи и слизистых оболочек, а также тенденция показателя микробной обсемененности мочи ниже критической величины, особенно у детей раннего возраста, создают определенные сложности в лабораторной диагностике заболевания и обосновывают необходимость поиска дополнительных критериев индикации возбудителя.

Создание диагностического алгоритма при изолированном синдроме бактериурии будет способствовать оптимизации обследования больного и принятию адекватных терапевтических мероприятий.

Новые подходы к лабораторной диагностике при синдроме бактериурии у детей включают определение вида возбудителя, вирулентности с исследованием факторов бактериальной персистенции, направленных на инактивацию механизмов естественной резистентности микроорганизма.

Цель работы – характеристика бактериурии различного генеза у детей и оценка роли факторов персистенции уроштаммов микроорганизмов (антилизоцимной и антиинтерфероновой активности) в их дифференциации

Выбор данных биологических характеристик микроорганизмов в качестве возможных критериев индикации возбудителя уроренальной инфекции не является случайным. Изучение иммунодепрессивной активности инфицирующей микрофлоры исключительно важно для понимания патогенеза заболеваний, вызванных условно-патогенными бактериями [5, 6].

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

При пиелонефрите, кишечном дисбактериозе с синдромом изолированной бактериурии у больных и практически здоровых детей проведено исследование мочи с выделением и идентификацией микроорганизмов и изучением биологических свойств секторных посевов по Гоулду с определением степени бактериурии.

Микробиологические исследования основывались на изучении свойств у 561 уроштамма условно-патогенных бактерий – возбудителей пиелонефрита у детей: у 306 штаммов кишечной палочки, 42 штаммов протей, 63 штаммов клебсиелл, 24 штаммов энтеробактера, 32 штаммов цитробактера, 9 штаммов патогенных энтеробактерий йерсиний энтероколита, 30 штаммов синегнойной палочки, 39 штаммов эпидермального стафилококка, 6 штаммов золотистого стафилококка и 10 штаммов энтерококка.

Группу сравнения составили 302 штамма микроорганизмов, выделенных из мочи 140 детей с контаминационной транзиторной бактериурией при обследовании 583 детей, преимущественно дошкольного возраста. У практически здоровых детей частота транзиторной контаминационной бактериурии составила $24 \pm 1,8\%$, у остальных детей ($76 \pm 1,8\%$) моча оказалась стерильной. Эти дети не имели патологического мочевого осадка (кроме однократного посева микрофлоры в количестве 1–10 тыс. КОЕ/мл мочи) и клинических признаков инфицирования органов мочевой системы в момент обследования и по анамнестическим данным. От каждого ребенка при транзиторной бактериурии биологические свойства определялись у 2–3 колоний, выросших на кровяном агаре. Видовой состав при транзиторной бактериурии был представлен штаммами эшерихий (124), клебсиелл (20), протеев (16), цитробактера (12), микрококка (8), эпидермального стафилококка (70), зо-

лотистого стафилококка (6), энтерококка (30) и ацинетобактера (16).

Изучение биологических характеристик микрофлоры при изолированной бактериурии проводилось у 46 штаммов энтеробактерий и псевдомонад, выделенных из мочи детей с кишечным дисбактериозом II–III степени.

У выделенных микроорганизмов по описанным методикам [7, 8] определены маркеры персистенции: антилизоцимная активность и способность флоры к инаktivации антибактериальной составляющей препарата человеческого лейкоцитарного интерферона (антиинтерфероновая активность).

Маркеры персистенции использовались нами для доказательства этиологической роли микрофлоры мочи при пиелонефрите у детей с невысокой степенью бактериурии – в диапазоне от 1 тыс. до 10 тыс. КОЕ/мл мочи [9, 10]. Материалы, полученные в результате исследований, подвергнуты статистической обработке [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе работы проведен анализ бактериурии у детей при пиелонефрите. По результатам исследований рост возбудителя пиелонефрита на питательных средах в диагностически значимой концентрации (≥ 100 тыс. КОЕ/мл мочи) получен у $73,2 \pm 2,4\%$ детей без учета их возраста; реже у детей первого года жизни ($50,8 \pm 6,3\%$). У детей раннего, дошкольного и школьного возраста высокая степень бактериурии отмечалась с большей частотой – в 72, 79 и 81% наблюдений соответственно.

Отчетливая тенденция к низкому микробному числу мочи выявлена нами при протейной почечной инфекции: содержание бактерий в пределах 1–50 тыс. КОЕ в 1 мл мочи наблюдалось независимо от возраста у $53,8 \pm 6,9\%$ больных, достигая величины $66,6 \pm 8,2\%$ у детей грудного возраста. В сравнении с протейным пиелонефритом эшерихиозной этиологии характеризовался более высокой микробной обсемененностью мочи: бактериурия 100 тыс. и более КОЕ в 1 мл мочи имела место у 163 детей из 203 ($80,3 \pm 2,3\%$) при высевах из мочи кишечной палочки. Псевдомонады у наблюдаемых больных высевались в малом количестве – в пределах от 3 до 10 тыс. КОЕ/мл мочи.

Высев микстной инфекции из мочи затрудняет решение вопроса о том, каким именно видом микроорганизмов обусловлена клиническая картина заболевания. Согласно нашим наблюдениям, ассоциативный характер микрофлоры при пиелонефрите у детей выявлен только в 1% наблюдений.

Столь редкое выявление микстной ренальной инфекции у детей, включая детей грудного возраста, мы объясняем строгим соблюдением правил сбора мочи на бактериологический анализ (до начала антибактериальной терапии, после подмывания ребенка, из средней порции мочи при естественном мочеиспускании, под контролем медсестры детского нефрологического отделения, у детей первого года жизни – после пробуждения или вскоре после кормления).

Выявлены достоверные отличия между энтеробактериями и грамположительными кокками в частоте штаммов, ингибирующих лизоцим, и количественной характеристике признака. Антилизотимная активность оказалась наиболее выраженной у штаммов энтеробактерий: встречалась у $78,7 \pm 2,1\%$ клинических штаммов, вызывающих пиелонефрит, тогда как у кокковой микрофлоры антилизотимная активность выявлялась в 5 раз реже (у $14,5 \pm 4,7\%$ штаммов, $p < 0,001$), и средняя величина признака в 3 раза меньше, чем в группе энтеробактерий ($1,5 \pm 0,1$ мкг/мл против $4,2 \pm 0,1$ мкг/мл, $p < 0,001$). Средняя величина антилизотимной активности у энтеробактерий была наибольшей у протеев ($5,1 \pm 0,2$ мкг/мл) и минимальной у цитробактера ($1,9 \pm 0,1$ мкг/мл).

В группе грамположительных кокков инактивация лизоцима была обусловлена только уроштаммами эпидермального стафилококка ($20,5 \pm 6,4\%$ активных культур с уровнем признака $1,5 \pm 0,1$ мкг/мл). Среди клинических штаммов энтерококка и золотистого стафилококка, изолированных из мочи больных пиелонефритом, не найдено лизоцимингибирующих культур.

Антиинтерфероновая активность у штаммов семейства энтеробактерий при пиелонефрите у детей встречалась также с большой частотой ($88,9 \pm 1,4\%$) с уровнем признака $4,8 \pm 0,1$ ЕД. Среди клебсиелл и кишечных йерсиний все штаммы бактерий имели антиинтерфероновую активность и инактивировали бактерицидную составляющую препарата интерферона в диапазоне $4,9 \pm 0,3$ и $4 \pm 0,5$ ЕД соответственно. Среди других представителей энтеробактерий встречаемость антиинтерферонового признака оказалась на уровне $83,3$ – $87,5\%$, однако средняя величина антиинтерфероновой активности у штаммов цитробактера оказалась вдвое выше, чем у штаммов протеев ($6,0 \pm 0,4$ против $3,2 \pm 0,4$ ЕД, $p < 0,05$). Антиинтерфероновая активность у эшерихий – доминирующего патогена пиелонефрита – встречалась с частотой $87,3 \pm 1,9\%$ с уровнем активности $4,9 \pm 0,1$ ЕД.

Среди грамположительных кокков антиинтер-

фероновая активность встречалась реже (у $27,3 \pm 6\%$ культур) с низким уровнем признака ($1,6 \pm 0,2$ ЕД).

Нам не удалось выявить какой-либо закономерности в распространенности и уровне антилизотимной и антиинтерфероновой активности у эшерихий различных серологических групп, а также нетипируемых кишечных палочек и находящихся в серологической R-форме.

При выяснении связи изучаемых маркеров персистенции с источником выделения культур (больные пиелонефритом, здоровые дети) нами установлена важная в практическом отношении закономерность, положенная в основу метода дифференциации возбудителя пиелонефрита от сопутствующей микрофлоры, не имеющей отношения к развитию воспалительного процесса в почечной ткани.

Результаты исследования факторов бактериальной персистенции при транзиторной бактериурии, обусловленной контаминацией мочи флорой уретры и периуретральной области, показали, что среди энтеробактерий-контаминантов мочи у практически здоровых детей обнаружено лишь $14 \pm 2,6\%$ штаммов, инактивирующих лизоцим, с низким уровнем активности ($1,8 \pm 0,2$ мкг/мл) и $5,8 \pm 1,5\%$ культур с антиинтерфероновой активностью, равной $1,2 \pm 0,1$ ЕД. Полученные результаты персистирующих свойств у сопутствующей микрофлоры мочи существенно отличались от маркеров персистенции у кишечных бактерий – патогенов пиелонефрита у детей ($p < 0,05$).

Напротив, получены сходные результаты исследований факторов бактериальной персистенции среди кокков, изолированных из мочи здоровых детей и больных пиелонефритом. Так, уроштаммы кокков у здоровых детей инактивировали мурамидазу в $26,3 \pm 4,1\%$ в концентрации $2,0 \pm 0,4$ мкг/мл, а у больных – в $14,5 \pm 4,7\%$ с антилизотимной активностью $1,5 \pm 0,1$ мкг/мл, различия не являются существенными ($p > 0,05$).

Таким образом, наши данные свидетельствуют о существенных различиях в распространенности и величине антилизотимной и антиинтерфероновой активности у энтеробактерий – доминирующих возбудителей пиелонефрита у детей и распространенных контаминантов мочи и позволяют рекомендовать определение факторов персистенции в качестве дополнительных критериев для дифференциации возбудителя от сопутствующей микрофлоры [12, 13].

Достоверность определения возбудителя пиелонефрита по маркерам персистенции была доказана повторным выделением из мочи микрофлоры одного вида, относящейся к уропатогенным серо-

группам (для эшерихий) и положительным ответом макроорганизма в РПГА с парными сыворотками.

На втором этапе работы изучены биологические свойства уроштаммов микроорганизмов при изолированной бактериурии, обнаруженной у детей при субкомпенсированном кишечном дисбактериозе. Изолированная бактериурия характеризовалась большей распространенностью и более высоким уровнем маркеров персистенции бактерий по сравнению с микрофлорой, контаминирующей мочу здоровых детей. Так, антилизоцимная активность наблюдалась у энтеробактерий и псевдомонад при изолированной бактериурии с частотой $65,2 \pm 7,0\%$ с величиной признака $2,7 \pm 0,2$ мкг/мл. Антиинтерфероновая активность у этих штаммов выявлялась с частотой $54,3 \pm 7,3\%$, достигая среднего уровня $2,3 \pm 0,3$ ЕД. Изолированная бактериурия характеризуется малой вирулентностью выделенной микрофлоры, но в условиях снижения резистентности может трансформироваться в инфекцию мочевой системы [14].

ОБСУЖДЕНИЕ

В наших наблюдениях у 4,3% детей изолированная бактериурия трансформировалась в манифестный пиелонефрит, что диктует необходимость в каждом конкретном клиническом случае выяснять источник поступления микроорганизмов в мочевые пути и принимать меры воздействия на него.

На заключительном этапе работы мы предприняли попытку адаптировать классические методы определения антилизоцимной и антиинтерфероновой активности к условиям практических бактериологических лабораторий. Как известно, классические методы основаны на определении персистентных признаков у суточных агаровых культур бактерий. Нами разработана ускоренная модификация определения антилизоцимной и антиинтерфероновой активности урофлоры, основанная на оценке признаков одномоментно у всех колоний, выросших при первичном посеве мочи на агаре с лизоцимом (интерфероном). Учет результатов производится на 2 сут раньше по сравнению с классической методикой.

Поскольку при соблюдении правил сбора мочи для бактериологического анализа микробные ассоциации при пиелонефрите у детей, по нашим данным, встречаются, редко в соответствии с предложенной модификацией целесообразно первичный посев клинического материала в первый день исследования производить на мясопептонный агар Кольбака с лизоцимом (интерфероном). На второй день исследования подсчитывается степень

бактериурии с отсевом колоний для последующей идентификации выделенной микрофлоры. Затем производится инаktivация колоний парами хлороформа и нанесение слоя питательного агара с тест-культурой. Через сутки инкубации в термостате оцениваются факторы персистенции у всех колоний, выросших на чашке, и делается заключение о принадлежности урофлоры к возбудителю или к сопутствующим микроорганизмам. Учет результатов на основании определения факторов бактериальной персистенции у выделенных из мочи микроорганизмов производится через 40–48 ч с момента доставки клинического материала в лабораторию.

Помимо сокращения времени выдачи результатов, другим преимуществом модификации является повышение числа положительных результатов индикации возбудителя у детей с маломанифестными вариантами пиелонефрита, у которых урокультура характеризуется неоднородностью по маркерам персистенции. При этом исключается ошибка случайной выборки, которая неизбежна при определении факторов персистенции у отдельных колоний.

Полученные материалы свидетельствуют о том, что процент активных колоний на чашке Петри при секторальном посеве мочи зависит от степени активности пиелонефрита. Так, при обследовании детей с уроренальной инфекцией лишь у 25 больных с манифестным пиелонефритом (II–III степени активности) из 60 обследованных ($41,7 \pm 6,4\%$) в посеве мочи находили 100% колоний патогена с антиинтерфероновой активностью. У остальных 35 детей ($58,3 \pm 6,4\%$) с латентным пиелонефритом с I степенью активности воспалительного процесса на чашках с посевом мочи находили от 10 до 80% колоний возбудителя с антиинтерфероновой активностью.

Разработанные нами диагностические критерии индикации возбудителя пиелонефрита под контролем факторов бактериальной персистенции позволили отказаться от способа получения неконтаминированных проб мочи путем катетеризации мочевого пузыря из-за опасности инфицирования органов мочевой системы. Введение катетера разрушает защитный слой мукополисахаридов слизистой оболочки уретры, повреждает эпителий и обеспечивает доступ бактерий к клеткам глубоких слоев слизистой оболочки. Взятие мочи с помощью катетера проводят в исключительных случаях (если ребенок не способен мочиться).

Существует мнение о нецелесообразности использования массовых скрининговых программ для выявления изолированной бактериурии у детей в связи с большими финансовыми и трудовыми

ми затратами [15]. Вместе с тем, нами широко используется в клинической лаборатории микроскопия свежей нецентрифугированной неокрашенной мочи, собранной в стерильную посуду, что позволяет сочетать общий анализ мочи с ориентировочным скринингом на бактериурию. Выявление палочек или кокков при бактериоскопии является показанием для проведения бактериологического посева мочи для точной диагностики бактериурии, ее количественной и видовой характеристики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возбудители пиелонефрита высевались из мочи больных детей в 73,2±2,4% случаев. При этом, в 50% случаев у детей грудного возраста выявлена моноинфекция с превалированием энтеробактерий, обладающих большой распространенностью и высоким уровнем факторов персистенции (антилизоцимной и антиинтерфероновой активностью).

У практически здоровых детей частота транзиторной бактериурии, обусловленной контаминацией мочи, составила 24,1±1,8%, характеризовалась низкой степенью микробной обсемененности мочи и слабо выраженными маркерами персистенции у штаммов энтеробактерий.

Изолированная бактериурия у детей при субкомпенсированном кишечном дисбактериозе по частоте встречаемости и выраженности персистентных свойств энтеробактерий и псевдомонад занимает промежуточное положение между уропатогенами и контаминантами мочи, требует коррекции измененного кишечного микросимбиоза с включением препарата интерферона-виферона-1 или 2 в свечах. По 1 свече 2 раза в день в течение 10 дней, затем по 1 свече через день – 1 мес.

Для оценки этиологической значимости выделенной из мочи микрофлоры предложена модификация ускоренного определения антилизоцимной и антиинтерфероновой активности микроорганизмов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Вербицкий ВИ, Чугунова ОЛ, Яковлева СВ, Таболин ВА. Особенности течения, клиники и диагностики инфекционно-воспалительных заболеваний органов мочевой системы у детей раннего возраста. *Нефрология и диализ* 2001; 3 (2): 230-233
2. Халиуллина СВ, Анохин ВА, Поздеев ОК, Герасимова ЕС. Кишечный дисбиоз – этиологическая и патогенетическая основа синдрома бактериурии. *Казан мед журн* 2003; 84 (1):51-53
3. Вялкова АА. Роль факторов предрасположенности в формировании и хронизации тубулоинтерстициального нефрита у детей: Автореф. дис. д-р мед.наук. М., 1989: 46
4. Вялкова АА, Гриценко ВА. Роль инфекции в развитии соматической патологии у детей. В Игнатова МС., ред. Соматические болезни у детей. Руководство для врачей. ИПК «Южный Урал», М.-Оренбург, 2002:40-73
5. Бухарин ОВ. Персистенция патогенных бактерий. Медицина, М, 1999
6. Гриценко ВА. Микроэкологические аспекты инфекции мочевыделительной системы. В: Бухарин ОВ, ред. Экология микроорганизмов человека. УрО РАН, Екатеринбург, 2006: 289-470
7. Бухарин ОВ, Соколов ВЮ. Способ определения антиинтерфероновой активности микроорганизмов. А.с. СССР № 1564191
8. Бухарин ОВ, Усвятцов БЯ, Малышкин АП, Немцева НВ. Метод определения антилизоцимной активности микроорганизмов. *ЖМЭИ* 1984, (2): 27-28
9. Бухарин ОВ, Зыкова ЛС, Соколов ВЮ. Способ выявления инфекционного агента воспалительного процесса. А.с. СССР № 1688883
10. Зыкова ЛС, Керашева СИ, Чернова ОЛ. и др. Способ выявления возбудителя при гнойно-воспалительных процессах. А.с. СССР № 1449587
11. Лакин ГФ. *Биометрия*. Высшая школа, М., 1990
12. Гриценко ВА, Вялкова АА, Бухарин ОВ. Патогенетическое обоснование клинко-микробиологической классификации бактериурии. *Рос вестн перинат и педиатрии* 1977; (5): 43-48
13. Гриценко ВА, Бухарин ОВ, Вялкова АА. Факторы риска развития пиелонефрита у детей. *Рос вестн перинат и педиатрии* 1999; (6): 18-24
14. Smysłowska A, Kozłowski J, Zieliska E, Bodalski J. Urinary tract infections in children under three years of age. *Pol Mercuriusz Lek* 2003; 82 (4):319-321
15. Юшко ЕИ. Инфекция мочевыводящих путей у детей: эпидемиология, этиопатогенез, клиника, исходы и профилактика. *Урология* 2008; (2):57-64
16. Вялкова АА, Гриценко ВА, Гордиенко ЛМ. Инфекция мочевой системы у детей – новые решения старой проблемы. *Нефрология* 2010; 14 (4):63-75

Поступила в редакцию 09.04.2012 г.

Принята в печать 28.06.2012 г.