



Семейко Г.В.¹, Самойлович Е.О.¹, Байко С.В.²✉, Чередниченко М.Д.²

¹ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Этиологическая диагностика постдиарейного гемолитико-уремического синдрома у детей с использованием TaqMan Array карт

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Семейко Г.В. – микробиологическая часть исследований, обработка литературных источников, написание; Самойлович Е.О. – концепция, обработка литературных источников, написание и окончательное редактирование; Байко С.В. – концепция, сбор материала, обработка литературных источников, окончательное редактирование; Чередниченко М.Д. – сбор клинических данных и биологического материала, написание.

Подана: 30.11.2022

Принята: 12.12.2022

Контакты: baiko@yandex.ru

Резюме

Введение. Применение микропроточных TaqMan Array Cards (ТАС карт) стало одним из инновационных направлений микробиологии последних двух десятилетий, позволяя одновременно определять целый спектр энтеропатогенов (бактерий, вирусов, простейших, гельминтов).

Цель. Идентификация возбудителей кишечных инфекций у детей с постдиарейным гемолитико-уремическим синдромом (ГУС) с использованием метода ПЦР в реальном времени на основе ТАС карт.

Материалы и методы. В исследование включено 54 ребенка в возрасте от 9 месяцев до 10 лет с диагнозом ГУС, госпитализированных в УЗ «2-я городская детская клиническая больница» г. Минска в 2021 г.

Результаты. Гены энтеропатогенов, способных вызывать диарейный синдром, были выявлены у 39 (72,2%) из 54 обследованных детей: гены бактериальных патогенов (диареогенная *E. coli*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis*) – у 23 (42,6%), вирусных патогенов (рота-, норо-, адено-, саповирусов) – у 11 (20,4%), у 2 детей (3,7%) выявлены гены простейшего (*Cryptosporidium*), у 3 детей (5,6%) – гены и вирусных и бактериальных патогенов. Среди 25 детей с выявленной диареогенной *E. coli* у 20 (80,0%) присутствовала шигатоксин-продуцирующая *E. coli* (STEC). Во всех 20 случаях наличие STEC сопровождалось выявлением шигатоксина 2-го типа, в 8 из них одновременно присутствовал шигатоксин 1-го и 2-го типов. В 6 случаях выявлялись только STEC, в 8 – обнаружена энтерогеморрагическая *E. coli* (STEC/EHEC), у 6 – гибридные варианты (STEC/EAEC и STEC/EHEC/EAEC). 92,6% детей получали антибактериальные или кишечные противомикробные препараты на момент поступления в нефрологический центр. STEC выявлялись через 7 (5; 9) дней, максимально – 13 дней от начала диареи до забора фекалий.

Выводы. Полученные с использованием ТАС карт данные подтверждают роль STEC как основного этиологического агента ГУС. Роль других *E. coli* (не

шигатоксин-продуцирующих штаммов), а также других патогенов в развитии ГУС требует дальнейшего изучения. Целесообразно расширение алгоритма этиологической диагностики ГУС и генетического анализа обнаруженных гибридных вариантов диареогенных *E. coli*.

Ключевые слова: гемолитико-уремический синдром (ГУС), диареогенные *E. coli*, типирование, шигатоксин, микропроточные TAC карты

Galina V. Semeiko¹, Elena O. Samoilovich¹, Sergey V. Baiko²✉, Maria D. Charadnichenka²

¹ Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Etiological Diagnostics of Postdiarrheal Hemolytic Uremic Syndrome in Children Using TaqMan Array Cards

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Galina V. Semeiko – microbiological part of research, processing of literary sources, writing; Elena O. Samoilovich – concept, processing of literary sources, writing and final editing; Sergey V. Baiko – concept, material collection, processing of literary sources and final editing; Maria D. Charadnichenka – collection of epidemiological data and biological material, writing.

Submitted: 30.11.2022

Accepted: 12.12.2022

Contacts: baiko@yandex.ru

Abstract

Introduction. Applying of microfluidic TaqMan Array Cards (TAC cards) has become one of the innovative directions in microbiology of the last two decades, allowing simultaneous detection of a wide range of enteropathogens (bacteria, viruses, protozoa, helminths).

Purpose. Identification of the aetiology of diarrhoea in children with postdiarrheal hemolytic uremic syndrome (HUS) using real-time PCR based on TAC cards.

Materials and methods. A total of 54 patients aged 9 months to 10 years with HUS hospitalized at the 2nd City Children's Clinical Hospital in Minsk in 2021 were included in the study.

Results. Genes of enteropathogens responsible for diarrheal syndrome were identified in 39 (72.2%) of 54 examined children: genes of bacterial pathogens (diarrheal *E. coli*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis*) – in 23 (42.6%), viral pathogens (Rota-, Noro-, Adeno-, Sapoviruses) – in 11 (20.4%); in 2 children (3.7%) genes of the protozoan (*Cryptosporidium*) were detected, and in 3 children (5.6%) – genes of both viral and bacterial pathogens. Among 25 children diagnosed with diarrheagenic *E. coli*, 20 (80.0%) had shigatoxin-producing *E. coli* (STEC). In all 20 cases shigatoxin type 2 (stx2) was detected, in 8 of them both shigatoxin types 1 and 2 were present. In 6 cases, only STEC was detected, whereas enterohemorrhagic *E. coli* (STEC/EHEC) in 8 cases and hybrid variants in 6 cases (STEC/EAEC and STEC/EHEC/EAEC). 92.6% of children received antibacterial or intestinal antimicrobials at the time of admission to the nephrology center. STEC were

detected after 7 (5; 9) days, with a maximum of 13 days from the onset of diarrhea to fecal collection.

Conclusions. The data obtained using TAC cards confirm the role of STEC as the main etiological agent of HUS. The role of other *E. coli* (non-shiga toxin-producing strains), as well as other pathogens, in the development of HUS requires further study. It is advisable to expand the algorithm for HUS etiological diagnosis of and genetic analysis of detected hybrid variants of diarrheal *E. coli*.

Keywords: hemolytic uremic syndrome (HUS), diarrheagenic *E. coli*, typing, shiga toxin, TaqMan Array Cards

■ ВВЕДЕНИЕ

Гемолитико-уремический синдром (ГУС) – это клинико-лабораторный симптомокомплекс, включающий неиммунную (Кумбс-отрицательную) микроангиопатическую гемолитическую анемию, тромбоцитопению и острое почечное повреждение [1, 2].

Для ГУС свойственна гетерогенность форм. Наиболее частая форма – типичный или постдиарейный ГУС (тГУС) – связана с бактериями, продуцирующими шигатоксин (Stx): *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* 1-го типа, *Citrobacter freundii*. Реже встречается ГУС, ассоциированный со стрептококком, продуцирующим нейраминидазу, – пневмококковый ГУС [3, 4]. Наиболее редкая форма – атипичный ГУС, определяется как системное заболевание генетической природы, в основе которого лежит неконтролируемая активация альтернативного пути системы комплемента [2].

Доля тГУС среди всех форм ГУС составляет 90% в детском возрасте. Ведущим этиологическим агентом, ответственным за развитие тГУС, является шигатоксин-продуцирующая *E. coli* (STEC). Для стран Латинской Америки инфекция, обусловленная STEC, является эндемичной патологией, что объясняется тесным контактом местного населения с крупным рогатым скотом. Для европейского континента характерны меньший уровень заболеваемости, а также протекание данной инфекции по типу вспышек. Многие крупные вспышки, зарегистрированные в разное время во многих странах мира, включая США, Канаду, Японию, европейские государства, были связаны с *E. coli* серотипа O157:H7 [5]. Этот серотип остается частой причиной вспышек по сей день и ответственен за более чем один миллион случаев диареи и примерно 2000 случаев STEC-ГУС во всем мире ежегодно. Одна из последних наиболее крупных вспышек, вызванная *E. coli* серотипа O104:H4, была зафиксирована в Германии в 2011 г. Она привела к заболеванию около 4000 человек, у 800 из которых заболевание осложнилось ГУС [6].

Заболеваемость тГУС у детей в Республике Беларусь является одной из самых высоких среди стран Европы. За период 2005–2014 гг. показатель заболеваемости составил 3,8 (2,9–5,6) на 100 000 детей до 5 лет и 1,4 (1,0–2,1) на 100 000 детей до 15 лет, за период 2015–2019 гг. – 5,0 (3,8–6,6) и 2,3 (1,6–2,7) соответственно [7]. В 2021 г. заболеваемость составила 10,6 на 100 000 детей <5 лет и 5,0 на 100 000 детей до 15 лет, преимущественно за счет эпидемической вспышки в осенний период, когда с 27 сентября по 29 октября было выявлено 45 заболевших [8].

ГУС остается одной из наиболее частых причин острого почечного повреждения у детей. Среди 66 пациентов 0–17 лет с острым почечным повреждением в

Беларуси, которым в 2018 г. проводился диализ, доля детей с ГУС составила 29% [9]. Однако, несмотря на имеющийся в Республике Беларусь большой опыт клинической диагностики и ведения пациентов с ГУС, вопросы этиологической диагностики постдиарейного ГУС разработаны недостаточно. Среди 174 случаев тГУС, выявленных в 2015–2019 гг., только у 18,7% пациентов удалось установить этиологическую причину заболевания – STEC-ГУС, обусловленный шигатоксином *E. coli* [7].

В последние годы в литературе появляются данные о роли других *E. coli* (не шигатоксин-продуцирующих), а также иных патогенов в этиологии ГУС, что частично объясняется новыми возможностями современной диагностики. Перечень бактериальных агентов, с которыми может быть ассоциировано развитие ГУС, имеет тенденцию к расширению. Одним из потенциальных претендентов на включение в него является *Campylobacter*, который считается одной из наиболее распространенных в мире бактериальных причин гастроэнтерита у людей [10]. В литературе практически ежегодно появляются сообщения о случаях ГУС, ассоциированных с этим патогеном [11–14].

Современные молекулярные методы исследований являются важным инструментом в расширении этиологической диагностики. Инновационная разработка последних двух десятилетий – микропроточные TaqMan Array Cards (ТАС карты), которые позволяют одновременно определять множество возбудителей в одном образце на основе количественной ПЦР в реальном времени [15]. Карта представляет из себя 384-луночную планшету, в лунки которой предварительно помещены лиофилизированные праймеры и зонды. Одна карта предназначена для тестирования 8 образцов, каждый из которых исследуется в 48 лунках на одну или две мишени в каждой из лунок.

Впервые ТАС карты были использованы для исследования экспрессии генов человека в 2006 г., но значительно более широкое применение они получили для определения возбудителей инфекционных заболеваний [16, 17]. К настоящему времени появились публикации по результатам применения количественной ПЦР в реальном времени с использованием ТАС карт, однако даже небольшой опыт применения данного метода свидетельствует о его большой перспективности [10, 18]. Несмотря на то, что он является достаточно дорогостоящим, требует тщательной подготовки (деконтаминации) лаборатории перед исследованием, проведения последующего серьезного биоинформационного анализа полученных результатов, метод дает возможность одномоментного исследования на большой перечень энтеропатогенов и является незаменимым в диагностике инфекций, в том числе и имеющих смешанную этиологию. Кроме того, метод дает возможность одновременного типирования ряда энтеропатогенов. В частности, в отношении *E. coli* метод позволяет проводить идентификацию пяти диареегенных патотипов посредством выявления характерных генов вирулентности: ETEC – энтеротоксигенная *E. coli* (на основании обнаружения токсинов LT, ST_H, ST_r и факторов адгезии и колонизации CFA/I и CS1–CS6), EPEC – энтеропатогенная *E. coli* (интимина *eae* и пучок-формирующих пилей *bfpA*), EAEC – энтероагрегативная *E. coli* (факторов адгезии *aaiC*, *aatA*, *aar*, *aggR*), EIEC – энтероинвазивная *E. coli* (инвазина *ipaH*) и STEC – шигатоксин-продуцирующая *E. coli* (шигатоксина 1-го и 2-го типа – *stx1* и *stx2*).

Исследования последних десятилетий, посвященные изучению STEC, показали наличие в этой патогруппе высоковирулентных для человека штаммов подгруппы

энтерогеморрагических *E. coli* (EHEC), которые кроме генов *stx*, кодирующих продукцию шигаподобных токсинов, содержат ген *eae*, кодирующий адгезин, называемый интимином – белок наружной мембраны, характерный для ЕРЕС. Исследования последних лет указывают на появление «гибридных» вариантов, к ним относят энтеро-агрегативные шигатоксин-продуцирующие *E. coli* (STEC/EAEC), вызывающие гемоколиты [4–6, 19, 20].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Идентификация возбудителей кишечных инфекций у детей с постдиарейным ГУС с использованием метода ПЦР в реальном времени на основе 384-луночных микро-проточных ТАС карт.

В задачи исследования входило:

- определить спектр патогенов (бактерий, вирусов, простейших), присутствующих в образцах стула пациентов с ГУС;
- оценить возможности метода для идентификации и типирования диареегенной *E. coli*;
- оценить роль других *E. coli* (не шигатоксин-продуцирующих штаммов), а также других патогенов в этиологии ГУС.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 54 пациента с ГУС в возрасте от 9 мес. до 10 лет (медиана возраста 3,3 (1,9; 5,6) года), госпитализированных в Республиканский центр детской нефрологии и заместительной почечной терапии (нефрологический центр) на базе УЗ «2-я городская детская клиническая больница» г. Минска за 2021 г. 92,6% (50/54) детей получали антибактериальные или кишечные противомикробные препараты на момент поступления в нефрологический центр.

У всех пациентов проведен забор фекалий в стерильные пробирки в количестве не менее 0,5 г или 0,5 мл с последующей доставкой в лабораторию вакциноуправляемых инфекций РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. До начала исследования пробы хранились замороженными при –80 °С.

Выделение тотальной нуклеиновой кислоты (РНК и ДНК) проводили с использованием набора QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Германия) с модификациями, включавшими предварительное механическое измельчение пробы при помощи стеклянных бусин и дополнительный этап инкубации в течение 5 мин. при 95 °С.

В качестве внешних контролей экстракции ДНК и РНК во все образцы вносили вирус герпеса туленей (Phocine Herpes virus) и фаг MS2 соответственно. Каждая партия образцов для экстракции также включала одну пробу отрицательного контроля для мониторинга загрязнения.

Детекцию ДНК/РНК кишечных патогенов выполняли с использованием набора реагентов AgPath-ID One Step RT-PCR Reagents (Applied Biosystems, США) на 384-луночных ТАС картах (Applied Biosystems, США). Каждый образец был исследован на наличие 34 патогенов, способных вызывать диарею, включая:

- вирусы: Adenovirus, Astrovirus, Rotavirus, Norovirus, Sapovirus;
- бактерии: *Aeromonas*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* (EAEC, ETEC, EPEC, STEC, EIEC), *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Plesiomonas*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*;

- простейшие: *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia*, *Isospora*, *Microsporidia* (*Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*);
- гельминты: *Ancylostoma*, *Ascaris*, *Necator*, *Hymenolepis nana*, *Schistosoma*, *Strongiloides*, *Trichuris*.

Анализ данных выполняли с помощью лицензионного программного обеспечения QuantStudio 7 Real-Time PCR software v 1.3 (Life Technologies, США) со стандартизованными порогами флуоресценции. Согласно инструкции разработчика, образцы со значением порогового цикла (Ct) менее 35 считались положительными. Отрицательными результаты засчитывались только тогда, когда соответствующий внешний контроль был положительным. Положительными результаты засчитывались только тогда, когда соответствующий отрицательный контроль экстракции был отрицательным.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel. Рассчитывали долю (%), медиану и межквартильный интервал Me (LQ; UQ).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных с использованием ТАС карт исследований образцов стула детей с ГУС присутствие одного или нескольких генов энтеропатогенов было выявлено у 39 из 54 (72,2%) детей. Гены бактериальных патогенов были выявлены у 23 (42,6%), вирусных – у 11 (20,4%) детей, у 3 детей (5,6%) были выявлены гены и вирусных, и бактериальных патогенов, у двух (3,7%) – гены простейшего (*Cryptosporidium*).

Как и следовало ожидать, наиболее частой находкой были гены диареегенной *E. coli*, выявленные у 25 (46,3%) детей. Из бактериальных патогенов у четырех детей были обнаружены гены, кодирующие токсин В токсин-продуцирующей *Clostridium difficile*, которые во всех случаях сочетались с генами диареегенной *E. coli*. У трех детей были обнаружены гены *Campylobacter*. В одном случае это был единичный патоген, в двух других случаях он выявлялся в сочетании с ЕНЕС и ЕАЕС. Еще в одном случае был обнаружен *Bacteroides fragilis*, который выявлялся в сочетании с гибридным вариантом ЕНЕС/ЕАЕС.

Из вирусных энтеропатогенов удалось обнаружить гены четырех возбудителей: ротавируса, норовируса, аденовируса, саповируса. Аденовирусы серотипа 40/41 были выявлены у 6 пациентов: в 3 случаях они являлись единственным обнаруженным возбудителем, в 2 случаях – в сочетании с норовирусом, в одном – в сочетании с гибридным вариантом ЕНЕС/ЕАЕС. Ротавирусы встречались у 4 пациентов, из них в 1 случае – в сочетании с ЕНЕС и норовирусом. Саповирус обнаружен в 2 случаях. У 5 детей был выявлен норовирус, в том числе два случая в сочетании с аденовирусом и по одному случаю – с ЕНЕС и с ЕНЕС и ротавирусом.

Достаточно частое обнаружение вирусов в образцах стула детей с ГУС, с нашей точки зрения, связано с продолжительным периодом времени от начала диарейного синдрома до забора образцов стула на исследование с использованием ТАС карт, который составил 8 (5; 10) дней, в случае выявления STEC – 7 (5; 9) дней, максимально – 13 дней. Нахождение в стационарах способствует вирусному инфицированию, которое само по себе не имеет отношения к этиологии ГУС, но может отягощать его течение.

Использование метода количественной ПЦР в реальном времени на основе 384-луночных ТАС карт предоставило возможности не только для идентификации, но и для типирования диареегенной *E. coli*.

Среди 25 случаев выявления диареегенной *E. coli* в 20 обнаружены гены шигатоксина. Из них в 12 случаях выявлялся шигатоксин 2-го типа, в 8 случаях имело место одномоментное обнаружение шигатоксинов 1-го и 2-го типов. В 6 случаях шигатоксин являлся единственным фактором патогенности, в 14 случаях он выявлялся вместе с другими факторами, характерными для диареегенных *E. coli* (см. таблицу). В частности у 8 детей обнаружена энтерогеморрагическая *E. coli* (STEC/ЕНЕС), у 6 – гибридные варианты (энтероагрегативная шигатоксин-продуцирующая (STEC/ЕАЕС) – 2 и STEC/ЕНЕС/ЕАЕС – 4) (см. таблицу). В одном из гибридных штаммов STEC/ЕНЕС/ЕАЕС был обнаружен ген адгезина CS1, характерный для ЕТЕС, однако гены, отвечающие за токсинопродукцию, выявлены не были, поэтому данный штамм не относили к энтеротоксигенным.

В 9 из 25 положительных на *E. coli* образцов присутствовали маркеры других возбудителей: в 4 – *Clostridium difficile*, в 2 – *Campylobacter*, в 1 – *Bacteroides fragilis*, в 3 образцах присутствовали вирусы – норовирус, аденовирус 40/41 и норо- + рота-вирус.

Таким образом, полученные с использованием ТАС карт данные подтверждают ведущую роль STEC в этиологии тГУС, которые обнаруживаются в 80,0% (20/25) образцов стула, содержащих диареегенные *E. coli*. В 5 случаях были обнаружены другие не шигатоксин-продуцирующие патотипы *E. coli* (в трех случаях – ЕАЕС, в двух – ЕРЕС). Поскольку и ЕРЕС, и ЕАЕС обладают генами вирулентности и способны к продукции собственных токсинов, их роль в развитии ГУС исключить нельзя [20, 21]. Следует отметить, что вспышка геморрагического колита и ГУС в 2011 г. в Германии была вызвана штаммом O104:H7, который содержал гены ЕАЕС (aggR, aggA, set1, pic и aap) и профаг, кодирующий ген stx2 (STEC/ЕАЕС) [6].

Campylobacter был идентифицирован в образцах стула у трех детей. Если у одного ребенка гены *Campylobacter* выявлялись в сочетании с генами STEC/ЕНЕС, у другого – в сочетании с ЕАЕС, то у третьего *Campylobacter* был единственным выявленным патогеном. Являлся ли данный возбудитель этиологическим агентом ГУС – вопрос спорный. Несмотря на то что в мире регистрируются новые случаи ГУС, связанные с *Campylobacter*, на настоящем этапе не ясны ни сама возможность индукции ГУС данным возбудителем, ни патогенез этого состояния. Нет убедительных доказательств

Результаты типирования диареегенной *E. coli* и определения типа шигатоксина с использованием метода количественной ПЦР в реальном времени на основе ТАС карт
Results of typing of diarrheagenic *E. coli* and determination of the type of shigatoxin using quantitative real-time PCR method based on TAC cards

Патотип <i>E. coli</i>	Количество выявленных штаммов, абс.	Из них продуцировали	
		шигатоксин типа 2 (stx2)	шигатоксины типов 1 и 2 (stx1 + stx2)
ЕАЕС	2	–	–
ЕРЕС	3	–	–
STEC	6	5	1
STEC/ЕНЕС	8	3	5
STEC/ЕАЕС	2	2	–
STEC/ЕНЕС/ЕАЕС	4	2	2
Всего	25	12	8

как шигатоксин-обусловленного, так и нейраминидазного механизма развития ГУС при кампилобактерных инфекциях. Учитывая высокую частоту развития при инфекциях, вызванных *Campylobacter*, таких аутоиммунных патологий, как синдром Гийена – Барре, реактивные артриты, не представляется возможным исключить аутоиммунный механизм развития ГУС при этих заболеваниях [13]. Следовательно, роль *Campylobacter* как потенциального агента ГУС, а также патогенез подобных состояний при кампилобактерных инфекциях нуждаются в дальнейшем изучении.

Токсин-продуцирующая *Clostridium difficile* была обнаружена у четырех детей наряду с диареегенной *E. coli*. Согласно европейским и российским рекомендациям по диагностике *Clostridium difficile*-ассоциированной диареи, необходимо использовать не менее 2 различных методов для получения достоверного результата для доказательства участия этого возбудителя в развитии заболевания. Применение только одного метода ПЦР, направленного на обнаружение гена, кодирующего токсин В, свидетельствует о присутствии в образце возбудителя *Clostridium difficile*, способного синтезировать токсин, однако не подтверждает токсинопродукцию, для этого рекомендуется выявлять сам токсин с помощью других методов (ИФА или ИХА) [22, 23]. Таким образом, полученные нами результаты детекции токсин-продуцирующей *Clostridium difficile* являются недостаточными, чтобы судить о роли этого патогена в развитии диареи, предшествовавшей ГУС.

Находка в образцах стула у двух детей *Cryptosporidium* оказалась весьма неожиданной. У одного пациента этот агент присутствовал в достаточно высокой концентрации (значение St составило 25), у другого – в более низкой (St равно 32), но никаких других патогенов выявлено не было. Как известно, криптоспоридиоз у иммунокомпетентных лиц проявляется водянистой диареей. Он существенно более опасен, вплоть до вероятности летального исхода, для иммунодефицитных лиц. В литературе описан случай ГУС, ассоциированного с *Cryptosporidium*, у иммунокомпетентного 5-летнего пациента в Японии [24]. Ребенок находился на перитонеальном диализе 24 дня, заболевание закончилось полным восстановлением функции почек. По мнению авторов, в случаях постдиарейного ГУС, не связанного с шигатоксин-продуцирующей *E. coli*, следует исследовать даже самые редкие причины гастроэнтерита.

Применение метода количественной ПЦР в реальном времени на основе 384-луночных ТАС карт позволило подтвердить этиологическую роль STEC в 37,0% случаев (20/54). До его применения этиологическую расшифровку диагноза в Республике Беларусь имели только 18% постдиарейных ГУС [7]. Как известно, ПЦР-исследование фекального материала играет важную роль в диагностике ГУС, но не способно обеспечить этиологическую диагностику каждого случая. Современная диагностика, позволяющая подтвердить наличие инфекции, вызываемой STEC, необходимая для дифференциации STEC-ГУС и атипичного ГУС, должна быть комплексной и включать исследование кала с помощью посева на питательные среды, обнаружение генов *stx*, кодирующих шигатоксин, с помощью ПЦР, а также применять серологические методы исследования, направленные на выявление антител к липополисахаридам *E. coli* (анти-ЛПС-антител), которые помогают существенно увеличить долю этиологически подтвержденных случаев эшерихиоза. В недавно опубликованном исследовании, выполненном в Аргентине, STEC-ГУС был диагностирован у 38,7% детей с постдиарейным ГУС с использованием мультиплексной ПЦР (*stx1*, *stx2*, *rfbO157*) и в 88,9% случаев при дополнительном исследовании на анти-ЛПС-антитела к серотипам O157,

O145 и O121 *E. coli* [25]. В отличие от исследования фекального материала, когда скорость выделения патогенов быстро снижается (в течение 1 недели после появления начальных симптомов), серология расширяет временное окно для диагностики СТЕС-инфекций [26–28].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного нами исследования можно сделать вывод, что использование метода ПЦР в реальном времени на основе ТАС карт является весьма удобным и информативным для этиологической диагностики ГУС. Требуются дальнейшие исследования, направленные на типирование *E. coli*, в частности определение серотипа O157:H7, с которым связаны многие крупные вспышки. Целесообразно иметь возможность идентификации и не-O157 шигатоксин-продуцирующих *E. coli*, включая высокопатогенный для человека эпидемический штамм *E. coli* серотипа O104:H4, вызвавший крупную вспышку в Германии и других странах Европы в 2011 г. Обнаружение в нашем исследовании значимого числа гибридных вариантов диареегенной *E. coli* демонстрирует необходимость проведения более глубокого генетического анализа и сиквенс-типирования, в том числе и с использованием полногеномного секвенирования.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Noris M, Remuzzi G.J. Hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(4):1035–1050. doi: 10.1681/ASN.2004100861
2. Loirat C, Fakhouri F, Ariceta G, Besbas N, Bitzan M, Bjerre A, Coppo R, Emma F, Johnson S, Karpman D, Landau D, Langman C.B., Lapeyraqe A.L., Licht C., Nester C., Pecoraro C., Riedl M., van de Kar N.C., Van de Walle J., Vivarelli M., Frémeaux-Bacchi V. An international consensus approach to the management of atypical hemolytic uremic syndrome in children. *Pediatr Nephrol*. 2016;31(1):15–39. doi: 10.1007/s00467-015-3076-8
3. Copelovitch L, Kaplan B.S. Streptococcus pneumoniae-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2008;23(11):1951–1956. doi: 10.1007/s00467-007-0518-y
4. Keenswijk W, Degraeuwe E, Dhont E, Raes A, Vande Walle J. Hemolytic uremic syndrome associated with non-shiga toxin-producing infectious agents: expanding the shiga toxin theory. *J. Pediatr. Hematol. Oncol*. 2019;41(3):e179–e181. doi: 10.1097/MPH.0000000000001196
5. Bryan A, Youngster I, McAdam A.J. Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Clin Lab Med*. 2015;35(2):247–272. doi: 10.1016/j.cll.2015.02.004
6. Frank C, Werber D, Cramer J.P., Askar M., Faber M., an der Heiden M., Bernard H., Fruth A., Prager R., Spode A., Wadl M., Zoufaly A., Jordan S., Kemper M.J., Follin P., Müller L., King L.A., Rosner B., Buchholz U., Stark K., Krause G. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med*. 2011;365(19):1771–1780. doi: 10.1056/NEJMoa1106483
7. Sudnouskaya K., Baiko S., Sukalo A., Sheuchuk I. Hemolytic uremic syndrome in children in Belarus. *Medical news*. 2020;307(4): 65–68. (in Russian)
8. Baiko S., Samoilovich E., Semeiko G., Charadnichenko M. Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome in Children in Belarus: Epidemiology, Features of Clinical Course and Laboratory Changes, and Outcomes. *Pediatrics. Eastern Europe*. 2022;10(3):302–310. doi: 10.34883/PI.2022.10.3.001 (in Russian)
9. Baiko S., Sukalo A., Sheuchuk I., Svirskaya O., Osvetinskaya Y., Ryabushko E., Strizhak M., Ocheretny M., Omelchenko N., Valuevich A., Panov A., Tyushnikov O. Renal replacement therapy of acute kidney injury in children in Belarus. *Nephrology and Dialysis*. 2019;21(4):518–519. doi: 10.28996/2618-9801-2019-4-518-523. (in Russian)
10. Cohen A.L., Platts-Mills J.A., Nakamura T., Operario D.J., Mwenda J.M., Weldegebriel G., Rey-Benito G., de Oliveira L.H., Ortiz C., Danniels D.S., Videbaek D., Singh S., Njambe E., Sharifuzzaman M., Grabovac V., Nyambat B., Logronio J., Armah G., Dennis F.E., Seheri M.L., Magagula N., Mphahlele J., Fumian T.M., Maciel I.T.A., Liette J.P.G., Esona M.D., Bowen M.D., Samoilovich E.O., Semeiko G.V., Abraham D., Giri S., Praharaj I., Kang G., Thomas S., Bines J., Liu N., Kyu H.H., Doxey M., McQuade Rogawski E.T., McMurry T.L., Liu J., Houpt E.R., Tate J.E., Parashar U.D., Serhan F. Aetiology and incidence of diarrhoea requiring hospitalisation in children under 5 years of age in 28 low-income and middle-income countries: findings from the Global Pediatric Diarrhea Surveillance network. *BMJ Glob Health*. 2022;7(9):e009548 doi: 10.1136/bmjgh-2022-009548
11. Carter J.E., Cimolai N. Hemolytic-uremic syndrome associated with acute *Campylobacter upsaliensis* gastroenteritis. *Nephron*. 1996;74(2):489. doi: 10.1159/000189403
12. Soper C.P., Sampson S.A., Velasco N. Renal thrombotic microangiopathy, campylobacter gastroenteritis and anti-cardiolipin antibody. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15(8):1261–1262. doi: 10.1093/ndt/15.8.1261-a
13. Bowen E.E., Hangartner R., Macdougall I. Campylobacter-Associated Hemolytic Uremic Syndrome Associated with Pulmonary-Renal Syndrome. *J Gen Intern Med*. 2016;31(3):353–356. doi: 10.1007/s11606-015-3403-6
14. Karpovich G., Vasyunin A., Krasnova E., Karpov M., Izvekova I., Surdina T., Enivatova L., Kuznetsova V. *Campylobacter*-associated hemolytic uremic syndrome in children: two case histories. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2020;3:93–107. doi: 10.31549/2542-1174-2020-3-93-107. (in Russian)

15. Heaney J., Rolfe K., Gleadall N.S., Greatorex J.S., Curran M.D. Low-density TaqMan Array Cards for the detection of pathogens. *Methods in Microbiol.* 2015;42:199–2018. doi: 10.1016/bs.mim.2015.06.002
16. Kodani M., Yang G., Conklin L.M., Travis T.C., Whitney C.G., Anderson L.J., Schrag S.J., Taylor T.H. Jr, Beall B.W., Breiman R.F., Feikin D.R., Njenga M.K., Mayer L.W., Oberste M.S., Tondella M.L., Winchell J.M., Lindstrom S.L., Erdman D.D., Fields B.S. Application of TaqMan low-density arrays for simultaneous detection of multiple respiratory pathogens. *J Clin Microbiol.* 2011;49(6):2175–2182. doi: 10.1128/JCM.02270-10
17. Liu J., Platts-Mills J.A., Juma J., Kabir F., Nkeze J., Okoi C., Operario D.J., Uddin J., Ahmed S., Alonso P.L., Antonio M., Becker S.M., Blackwelder W.C., Breiman R.F., Faruque A.S., Fields B., Gratz J., Haque R., Hossain A., Hossain M.J., Jarju S., Qamar F., Iqbal N.T., Kwambana B., Mandomando I., McMurry T.L., Ochieng C., Ochieng J.B., Ochieng M., Onyango C., Panchalingam S., Kalam A., Aziz F., Qureshi S., Ramamurthy T., Roberts J.H., Saha D., Sow S.O., Stroup S.E., Sur D., Tamboura B., Taniuchi M., Tennant S.M., Toema D., Wu Y., Zaidi A., Nataro J.P., Kotloff K.L., Levine M.M., Houpt E.R. Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. *Lancet.* 2016;388(10051):1291–1301. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31529-X
18. Platts-Mills J.A., Liu J., Rogawski E.T., Kabir F., Lertsethtakarn P., Siguas M., Khan S.S., Praharaj I., Murei A., Nshama R., Mujaga B., Havt A., Maciel I.A., McMurry T.L., Operario D.J., Taniuchi M., Gratz J., Stroup S.E., Roberts J.H., Kalam A., Aziz F., Qureshi S., Islam M.O., Sakpala P., Silapong S., Yori P.P., Rajendiran R., Benny B., McGrath M., McCormick B.J.J., Seidman J.C., Lang D., Gottlieb M., Guerrant R.L., Lima A.A.M., Leite J.P., Samie A., Bessong P.O., Page N., Bodhidatta L., Mason C., Shrestha S., Kiwelu I., Mduma E.R., Iqbal N.T., Bhutta Z.A., Ahmed T., Haque R., Kang G., Kosek M.N., Houpt E.R.; MAL-ED Network Investigators. Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhoea in children in low-resource settings: a reanalysis of the MAL-ED cohort study. *Lancet Glob Health.* 2018;6(12):e1309–e1318. doi: 10.1016/S2214-109X(18)30349-8
19. Karpman D., Loos S., Tati R., Arvidsson I. Haemolytic uraemic syndrome. *J Intern Med.* 2017;281(2):123–148. doi: 10.1111/joim.12546
20. Jensen B.H., Olsen K.E.P., Struve C., Krogfelt K.A., Petersen A.M. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(3):614–630. doi: 10.1128/CMR.00112-13
21. Nelson B.E., Hong A., Iqbal F., Jana B. A unique case of hemolytic-uremic syndrome secondary to enteropathogenic *E. coli*. *Clin Case Rep.* 2020;8(12):2625–2628. doi: 10.1002/ccr3.3221
22. Crobach M.J.T., Planché T., Eckert C., Barbut F., Terveer E.M., Dekkers O.M., Wilcox M.H., Kuijper E.J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:63–81. doi: 10.1016/j.cmi.2016.03.010
23. Sukhina M., Obratsov I., Mikhalevskaya V., Achkasov I., Safin A., Shelygin Yu. Algorithm for laboratory diagnostics of *Clostridium difficile* associated diarrhea. *Zh Microbiol.* 2018;2:45–53. doi: 10.36233/0372-9311-2018-2-45-53 (in Russian)
24. Printza N., Sapountzi E., Dotis J., Papachristou F. Hemolytic uremic syndrome related to *Cryptosporidium* infection in an immunocompetent child. *Pediatr Int.* 2013;55(6):788–790. doi: 10.1111/ped.12127
25. Fiorentino G.A., Miliwebsky E., Ramos M.V., Zolezzi G., Chinen I., Guzmán G., Nocera R., Fernández-Brando R., Santiago A., Exeni R., Palermo M.S. Etiological diagnosis of post-diarrheal hemolytic uremic syndrome (HUS): humoral response contribution. *Pediatr Nephrol.* 2022. doi: 10.1007/s00467-022-05671-6
26. Qin X., Klein E.J., Galanakis E., Thomas A.A., Stapp J.R., Rich S., Buccat A.M., Tarr P.I. Real-time PCR assay for detection and differentiation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2148–2153. doi: 10.1128/JCM.00115-15
27. Schindler E.I., Sellenriek P., Storch G.A., Tarr P.I., Burnham C.A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a single-center, 11-year pediatric experience. *J Clin Microbiol.* 2014;52(10):3647–3653. doi: 10.1128/JCM.01231-14
28. Wijnsma K.L., van Bommel S.A.M., van der Velden T., Volokhina E., Schreuder M.F., van den Heuvel L.P., van de Kar N.C. Fecal diagnostics in combination with serology: best test to establish STEC-HUS. *Pediatr Nephrol.* 2016;31:2163–2170. doi: 10.1007/s00467-016-3420-7