

© Коллектив авторов, 2014

Т.В. Спичак<sup>1</sup>, Л.К. Катосова<sup>2</sup>, С.Б. Яцышина<sup>3</sup>, С.С. Ким<sup>4</sup>, М.Н. Прагег<sup>3</sup>,  
О.А. Пономаренко<sup>2</sup>, И.В. Зубкова<sup>2</sup>

## КРИТИЧЕСКИЙ ВЗГЛЯД НА РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ МИКОПЛАЗМЕННОЙ ЭТИОЛОГИИ У ДЕТЕЙ

<sup>1</sup>Кафедра педиатрии и детской ревматологии педиатрического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, <sup>2</sup>Лаборатория микробиологии и лаборатория экспериментальной иммунологии и вирусологии НИИ Педиатрии ФГБУ «Научный центр здоровья детей» РАМН, <sup>3</sup>Отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, <sup>4</sup>Детская городская поликлиника № 138 ЮЗАО г. Москвы

С целью проведения сравнительного анализа этиологической диагностики *M. pneumoniae*-инфекции у 48 детей 3–17,5 лет с внебольничной пневмонией (ВП) средней тяжести выполнены исследования методами ПЦР в 38 трахеальных аспиратах и 48 – в мазках из ротоглотки (и 474 детей группы сравнения), а также тестирование ИФА парных сывороток от 48 больных и 45 детей группы сравнения на специфические антитела (АТ) к *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae*. У 16 (33,3%) больных ВП в парных сыворотках обнаружены IgM АТ к *M. pneumoniae*, IgA АТ в 1-й и 2-й пробах – у 12,8 и 10,4%, а IgG АТ – у 10,4 и 25% детей ( $p < 0,05$ ) соответственно. В группе сравнения IgM, IgA и IgG АТ выявлены соответственно у 6,6, 4,4 и 11,1% детей, что является признаком инapparантной или перенесенной инфекции. Методом ПЦР *M. pneumoniae* обнаружена только у 9 (18,8%) детей с ВП. Частота детекции *M. pneumoniae* методами ПЦР и ИФА совпала в 9 (56,2%) из 16 случаев. Все положительные результаты ПЦР на *M. pneumoniae* подтвердились выявлением IgM АТ. Из 39 ПЦР-негативных больных 7 имели серологические маркеры *M. pneumoniae*-инфекции, но у 5 из них исключена острая *M. pneumoniae*-инфекция. Принимая результаты ПЦР за «референтные», ИФА выявил 12,8% ложноположительных и 2,6% ложноотрицательных результатов. Таким образом, одновременная детекция *M. pneumoniae*-инфекции на основании определения АТ класса IgM (ИФА) и положительного результата ПЦР повышает надежность диагностики и позволяет точнее определить ведущий агент инфекции при серопозитивных вариантах одновременно на *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae*.

**Ключевые слова:** микоплазменная инфекция, ПЦР и ИФА диагностика, внебольничная пневмония, дети.

With the aim of the comparative study of *M. pneumoniae*-infection etiological diagnosis, PCR analysis and IFA in paired serum samples were carried out in 48 children (3–17,5 years of age) with moderate community-acquired pneumonia (CAP). PCR analysis was performed on 38 tracheal aspirate samples, 48 nasopharyngeal swab samples (474 children in control group). IFA in paired serum samples of 48 patients with CAP and 45 children of control group was carried out to identify *M. pneumoniae* and *S. pneumoniae* specific antibodies. *M. pneumoniae* IgM antibodies in paired samples were found in 16 (33,3%) patients with CAP, IgA were found in 12,8% and 10,4% (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> sample respectively), IgG – in 10,4% and 25% children respectively ( $p < 0,05$ ). In control group, IgM, IgA and IgG antibodies were discovered in 6,6%, 4,4% and 11,1% respectively, it is a sign of inapparant or past infection. PCR analysis revealed *M. pneumoniae* in 9 (18,8%) patients with CAP only. The frequency of *M. pneumoniae* detection by PCR and IFA methods matches in 9 of 16 cases (56,2%). All positive PCR results were proved by IgM antibodies detection. 7 of 39 PCR-negative

### Контактная информация:

Спичак Татьяна Владимировна – д.м.н., проф. каф. педиатрии и детской ревматологии педиатрического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

Адрес: 119991 г. Москва, Ломоносовский пр-кт, 2/62

Тел.: (903) 115-63-17, E-mail: tv.spichak@mail.ru

Статья поступила 19.03.14, принята к печати 31.03.14.

patients had *M. pneumoniae* – infection serum markers, but the diagnosis of acute *M. pneumoniae*-infection was ruled out in 5 of them. Considering PCR results as reference, IFA detected 12,8% false-positive and 2,6% false-negative results. Therefore, simultaneous *M. pneumoniae* detection based on IFA (IgM antibodies) and positive PCR results increases reliability of diagnosis and allows to identify the leading infection agent in combined *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae* serum positive types.

**Key words:** mycoplasmal pneumonia, PCR and IFA diagnostics, community-acquired pneumonia, children.

По числу выполненных исследований и публикаций инфекция, вызываемая *M. pneumoniae* у детей, относится к одной из наиболее обсуждаемых тем. Несмотря на несомненные успехи, достигнутые в изучении респираторного микоплазмоза, определившие свойства возбудителя и связанные с ним особенности воспалительного процесса в дыхательных путях, сохраняются серьезные проблемы, касающиеся достоверности диагностики микоплазменной инфекции (МИ) у детей.

Прежде всего следует отметить неспецифичность клинических проявлений МИ, на которые традиционно привыкли ориентироваться клиницисты. При подтверждении диагноза, отдавая приоритет лабораторным методам диагностики МИ, мы зачастую сталкиваемся с неоднозначными результатами, вызывающими новые вопросы.

Множество методов исследования, используемых для диагностики атипичных инфекций и обладающих разными уровнями чувствительности и специфичности, а также отсутствие стандартизованных диагностических подходов вызывают сложности при сопоставлении результатов, полученных при выполнении научных исследований, и не всегда удовлетворяют практическим потребностям клиницистов.

Для диагностики МИ в рутинной практике не используется бактериологический метод в связи с необходимостью особых сред для культивирования и длительностью (2–3 недели) роста возбудителя. Такие методы обнаружения антител (АТ) к *M. pneumoniae*, как реакция ингибции роста (РИР), реакция ингибции метаболизма (РИМ), микоплазмацидный тест и реакция связывания комплемента (РСК), также не находят практического применения из-за обязательного использования живых культур микоплазм [1].

Наиболее информативными методами лабораторной диагностики МИ признаны реакция иммунофлюоресценции (РИФ) и молекулярно-генетические методы (ПЦР-диагностика), а также определение специфических АТ при исследовании парных сывороток с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) или реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) [1].

Непосредственное обнаружение возбудителя, помимо бактериологического метода, может быть осуществлено путем выявления антигена *M. pneumoniae* с помощью РИФ, для которой созданы тест-системы на основе моноклональных АТ. Данный метод обладает высокой специ-

фичностью и чувствительностью при выявлении микоплазм в любом клиническом материале, в т.ч. в носоглоточных смывах [1–3]. Однако РИФ не может быть доступна широкому кругу диагностических лабораторий. Кроме того, данное исследование ограничено временными рамками. Микоплазменный антиген целесообразно выявлять в первые 10 дней болезни, поскольку в более поздние сроки он может находиться в составе циркулирующих иммунных комплексов [1].

К прямым методам быстрой диагностики инфекций относится молекулярно-генетический метод (ПЦР-диагностика), направленный на выявление ДНК возбудителя. Данный метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью и позволяет выявлять *M. pneumoniae* с первых дней болезни.

Отрицательный результат ПЦР-диагностики в большинстве случаев исключает инфекцию при соблюдении правил получения биологического материала и наличия в тесте контроля отсутствия ингибирования реакции компонентами биологических образцов. Однако нарушение правил организации лаборатории и проведения исследований может привести к ложноположительному результату при загрязнении (контаминации) лабораторных помещений фрагментами амплификации ДНК.

Развитие и совершенствование методов молекулярно-генетической диагностики и использование ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией ДНК возбудителя в режиме реального времени, обеспечивающей максимальную чувствительность, специфичность и контаминационную безопасность, позволяет с определенной надежностью диагностировать острую МИ. При этом ПЦР-исследование позволяет обнаруживать ДНК возбудителя в течение первых 3 недель (1–21-й день) от начала болезни [4] и даже после начала терапии антибактериальными средствами.

Тем не менее на современном этапе широкое практическое применение ПЦР-диагностики ограничено высоким уровнем затрат, связанных с необходимостью специального оснащения лабораторий, закупки дорогостоящего оборудования и реактивов. По этой причине в современных зарубежных руководствах по ведению внебольничной пневмонии (ВП) у детей метод ПЦР-диагностики для выявления атипичных инфекций не вошел в число обязательных в отличие от методов серологической диагностики, направленных на выявление специфических

АТ в парных сыворотках крови [5, 6]. Также следует учитывать, что ПЦР-исследование не позволяет дифференцировать острую инфекцию от персистенции микоплазменного возбудителя, предпосылки к которой заложены способностью микоплазм прикрепляться и паразитировать на клеточной мембране клеток человека с помощью *tip*-органелл, становясь недоступными для АТ, комплемента и других факторов защиты при локализации в инвагинатах клеточных мембран хозяина, а также способностью *M. pneumoniae* подавлять фагоцитарную активность клеток хозяина [1].

Широкомасштабных исследований по изучению уровня носительства *M. pneumoniae* в верхних отделах дыхательных путей у детей с использованием метода ПЦР не проводилось, однако заслуживают внимания две работы. В работе А.С. Nilsson и соавт. при исследовании мазков с задней стенки ротоглотки ДНК *M. pneumoniae* была обнаружена существенно реже у условно здоровых школьников по сравнению с пациентами, имевшими симптомы ОРЗ, основным из которых был кашель (0,4% vs 29% соответственно) во время подъема заболеваемости в Швеции. При этом ДНК возбудителя обнаруживалась длительно (в среднем 7 недель) [7].

В работе Е.В.М. Spuesens и соавт. частота обнаружения ДНК *M. pneumoniae* в мазках из носоглотки и ротоглотки детей без симптомов ОРЗ в Нидерландах в зависимости от эпидемического сезона и года наблюдения варьировала от 3% весной 2009 г. до 58% случаев летом 2011 г. (21% по всей выборке) [8]. При этом ДНК возбудителя не обнаруживалась спустя 1 месяц (редко 2–3 месяца) в мазках из носоглотки и ротоглотки, исследованных в динамике наблюдения. Большинство таких случаев, по-видимому, можно расценить как интраназальную инфекцию, сопровождающуюся специфическим иммунным ответом, поскольку авторы не отметили значимых различий по уровню IgM и доле положительных сывороток в группе детей без симптомов ОРЗ по сравнению с группой детей, имевших симптомы ОРЗ и обследованных в это же время.

Для серологической диагностики атипичных инфекций большинство практических лабораторий используют ИФА, который удобен в связи с доступностью отечественных тест-систем и возможностью быстрого получения ответа, или РНГА.

Признаком острого инфицирования является наличие АТ класса IgM, которые можно обнаружить, начиная с 5–7-го дня после появления первых симптомов болезни. К 6-й неделе болезни АТ класса IgM, как правило, не определяются. АТ класса IgA появляются со 2-й недели болезни, но исчезают быстрее АТ других классов. IgG-

АТ регистрируются на 2–3-й неделе от начала болезни при максимальном уровне АТ класса IgM и могут длительно сохраняться на низком уровне.

Поскольку после перенесенной МИ не формируется стойкий иммунитет, возможны случаи реинфицирования. Однако при микоплазменной реинфекции, которая, как и острая инфекция, нуждается в антибактериальной терапии, АТ класса IgM не вырабатываются.

Ложноотрицательные результаты серологического метода исследования можно снизить при условии исследования сыворотки крови, полученной после 7-го дня от начала болезни. В то же время не исключена вероятность ложноположительного результата по двум причинам. Существует возможность неспецифических положительных результатов за счет перекрестных реакций с нормальными АТ человека [1], а также вероятность бессимптомных форм инфекции, вызванной *M. pneumoniae*. В исследовании R. Nir-Paz и соавт. зарегистрировано присутствие IgM-АТ у 20% условно здоровых детей младшего и среднего школьного возраста без признаков респираторных инфекций в течение 30 дней [9]. Есть сообщения об обнаружении специфических к *M. pneumoniae* АТ при серологических обследованиях условно здоровых взрослых [2].

Использование парных сывороток, первая из которых берется в наиболее ранние сроки болезни, а вторая – спустя 10–14 дней, способствует решению перечисленных проблем. Нарастание титров АТ в 4 и более раз в парных сыворотках или сероконверсия считаются диагностически значимыми для МИ [1, 3]. Чувствительность и специфичность ИФА при использовании парных сывороток достигает 60–80 и 90–100% соответственно [4, 5, 10, 11].

Однако серологический метод исследования с использованием парных сывороток, повышая надежность диагностики МИ, имеет большее значение для ретроспективной ее диагностики при ВП.

При определении перспектив по улучшению выявления МИ при ВП у детей особый интерес исследователей вызывает использование метода ПЦР как теста быстрой диагностики и сопоставление результатов ПЦР-диагностики с результатами серологических исследований парных сывороток.

По данным исследования J.W. Dorigo-Zetsma и соавт., в котором оценивались диагностическая специфичность и позитивное прогностическое значение (PPV – positive predictive value)\* ПЦР с использованием мазков из ротоглотки по сравнению с культуральной диагностикой *M. pneumoniae* и тестом на основе фиксации комплемента (СФТ) у 92 детей с пневмонией и 74 детей без респираторных инфекций, составив-

\*positive predictive value – это вероятность получения истинно-положительного результата этиологической диагностики изучаемым методом по отношению к другому методу, признанному «золотым» стандартом диагностики.

ших контрольную группу, специфичность и PPV для ПЦР составила 100% [12].

Подобные высокие значения специфичности и PPV для ПЦР (97,6 и 92,3% соответственно) установлены при сопоставлении эффективности диагностики ВП, вызванной *M. pneumoniae*, методом ПЦР с использованием мазков из рото- и носоглотки и серологическим методом (ИФА) при исследовании, выполненном у детей с ВП: у 21 ребенка, серопозитивного на *M. pneumoniae*, и 42 детей, серонегативных в отношении *M. pneumoniae* [13].

Если принять за «золотой» стандарт лабораторной диагностики МИ ПЦР, диагностическая чувствительность и PPV при обнаружении IgM в одиночной сыворотке составляет 62,2 и 52,3% соответственно [14].

Полное совпадение результатов ПЦР и серологического исследования на *M. pneumoniae* колеблется от 39,3 до 48% [4, 15]. Положительные результаты ПЦР на ДНК *M. pneumoniae* в мокроте взрослых больных ВП редко (9,5% случаев) не подтверждаются серологическим методом исследования [15]. Чаще наблюдается обратная ситуация: обнаружение серологических маркеров МИ при отрицательных результатах ПЦР (49, 79 и 54,9% при использовании тест-систем Remel, Meridian и Savyon Diagnostics) [4, 15].

Цель исследования – провести сравнительный анализ этиологической диагностики МП методами ПЦР и серологического анализа (ИФА) у детей с ВП средней тяжести.

#### Материалы и методы исследования

В период с января по октябрь 2008 г. и с октября 2010 г. по декабрь 2011 г. обследованы 48 детей и подростков в возрасте от 3 лет до 17,5 лет с ВП средней тяжести, получавших лечение в амбулаторных условиях в одной из детских поликлиник г. Москвы. Среди условий включения в группу исследования были: рентгенологическое подтверждение пневмонии, отсутствие признаков бронхиальной обструкции, сбор материала для бактериологического исследования и ПЦР-диагностики до начала антибактериальной терапии.

Для обнаружения ДНК *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* с помощью ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией ДНК в режиме реального времени при исследовании 38 проб трахеальных аспиратов и 48 проб мазков со слизистой оболочки ротоглотки использовали набор реагентов производства ФБУН ЦНИИЭ «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydomphila pneumoniae-FL*». Наличие специфических АТ классов IgM, IgA и IgG к *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydomphila pneumoniae* определяли методом ИФА при тестировании парных сывороток от 48 больных с использованием наборов Savyon Diagnostics, Израиль (28 сывороток) и ELISA Medac, Германия (77 сывороток). Первую сыворотку забирали на 6–16-й день от начала болезни, вторую – с интервалом не менее 2 недель (на 17–30-й

день болезни). Оценку результатов реакции производили согласно рекомендациям производителя.

При использовании тест-набора фирмы Savyon Diagnostics положительный результат реакции для АТ к *M. pneumoniae* классов IgM и IgA оценивали при  $\geq 20$  BU/ml, для АТ класса IgG  $\geq 10$  BU/ml. При использовании тест-системы ELISA Medac положительный результат реакции для АТ к *M. pneumoniae* классов IgG и IgA оценивали при  $\geq 10$  усл. ед./мл, IgM-АТ оценивали качественно.

Группу сравнения для серологического исследования составили 45 детей из хирургического отделения НИИ Педиатрии ФГБУ «Научный центр здоровья детей» РАМН, 474 мазка со слизистой оболочки носоглотки и ротоглотки детей без признаков острого респираторного заболевания были исследованы в ПЦР.

#### Результаты и их обсуждение

Несмотря на небольшую группу наблюдения, мы столкнулись с определенными сложностями интерпретации результатов исследования, обсуждение которых может оказаться полезным как для других исследователей, так и для практикующих врачей.

Ставя перед собой задачу обнаружения специфических к *M. pneumoniae* АТ, начиная с 6-го дня болезни, мы не смогли выполнить это условие, поскольку оказались в ситуации, типичной для амбулаторной практики. Диагностика *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae*-инфекции редко начинается с первых дней болезни в связи с поздней обращаемостью больных из-за особенностей течения атипичных инфекций. Поводом для исследования, как правило, является затяжной кашель или затяжной обструктивный бронхит, не имеющий убедительной связи с аллергией, или отсутствие эффекта от назначенной антибактериальной терапии при пневмонии.

Так и в нашем исследовании, именно в группе детей, у которых с помощью лабораторных методов исследования была диагностирована МИ, из-за позднего обращения за медицинской помощью первая сыворотка была получена от пациентов на 11–16-й день от начала болезни в отличие от больных пневмонией иной этиологии, у которых первая сыворотка бралась на 6–10-й день от начала болезни.

Специфические АТ класса IgM к *M. pneumoniae* в парных сыворотках крови обнаружены у 16 (33,3%) из 48 больных с ВП. В одной пробе сыворотки крови, взятой у 47 больных в сроки от 11-го до 16-го дня болезни, АТ класса IgM к *M. pneumoniae* выявлены у 15 детей (табл. 1). Во 2-й сыворотке крови, взятой через 2 недели, их также имели 15 больных, в число которых вошли 14 детей, имевших их в 1-й сыворотке, и еще один ребенок, от которого не была получена сыворотка в острой фазе заболевания (1-я сыворотка), поскольку он начал обследоваться позже других. У одного больного во второй сыворотке крови IgM-АТ перестали обнаруживаться, а АТ

Таблица 1

Частота обнаружения АТ классов IgM, IgA и IgG к *M. pneumoniae* в парных сыворотках больных пневмонией и группы сравнения

Период исследования	АТ классов					
	IgM		IgA		IgG	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
<b>Больные ВП:</b>						
1-я сыворотка (n=47)	16*	33,3	6**	12,8	6***	12,8
2-я сыворотка (n=48)			5**	10,4	13***	27,1
Группа сравнения (n=45)	3	6,6	2	4,4	5***	11,1

\*Суммарный результат по двум сывороткам (комментарии в тексте), \*\* $p_{1-2} > 0,05$ ; \*\*\* $p_{1-2} < 0,05$ .

Таблица 2

Показатели серологических реакций и ПЦР у больных пневмонией

№ пациента	Период исследования	<i>M. pneumoniae</i>			<i>S. pneumoniae</i>			ПЦР
		АТ класса			АТ класса			
		IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	
1	2-я проба	244	52	46	-	1,3	2,0	<i>M. pn.</i>
	3-я проба	172	35	48	-	-	1,9	<i>M. pn.</i>
2	1-я проба	25	27	-	-	11,9	11,0	<i>M. pn.</i>
	2-я проба	107	47	26	1,7	6,6	4,0	
3	1-я проба	122	39	-	-	-	-	<i>M. pn.</i>
	2-я проба	106	39	17	-	-	-	
4	1-я проба	108	-	-	-	-	-	<i>M. pn.</i>
	2-я проба	146	61	65	-	-	-	
5	1-я проба	101	-	10	2,2	-	-	<i>M. pn.</i>
	2-я проба	122	-	50	-	-	-	
6	1-я проба	38	-	-	-	5,5	11,0	<i>M. pn.</i>
	2-я проба	123	-	23	-	-	11,4	
7	1-я проба	28	-	-	-	-	-	<i>M. pn.</i>
	2-я проба	150	-	-	2,2	-	-	
8	1-я проба	40	-	-	1,9	-	-	отр.
	2-я проба	49	-	20	2,9	-	12,9	
9	1-я проба	57	-	52	2,7	8,0	11,9	отр.
	2-я проба	51	-	23	2,9	8,3	11,8	
10	1-я проба	132	-	-	2,5	-	-	<i>M. pn.</i>
	2-я проба	112	-	11	1,7	-	-	
11	1-я проба	39	-	61	-	-	-	отр.
	2-я проба	22	-	46	-	-	-	
12	1-я проба	+	21	-	+	200	-	<i>S. pn.</i>
	2-я проба	+	12	-	+	200	-	
13	1-я проба	+	38	20	+	200	100	<i>S. pn.</i>
	2-я проба	+	18	-	+	200	100	
14	1-я проба	+	411	376	-	-	100	<i>M. pn.</i>
	2-я проба	+	372	575	-	-	-	
15	1-я проба	+	15	669	-	100	400	отр.
	2-я проба	+	-	205	-	100	200	
16	1-я проба	+	-	-	-	-	-	отр.
	2-я проба	-	-	-	-	-	-	

№ 1-11 – результаты получены с использованием наборов Savyon Diagnostics, Израиль (БУ/мл); № 12-16 – результаты получены с использованием наборов ELISA Medac, Германия (УЕ\*/мл); \*условная единица.

других классов не появились. Учитывая при этом отрицательный результат ПЦР-диагностики, МИ у данного ребенка была исключена.

АТ класса IgA в 1-й сыворотке крови найдены у 6 (12,8%) из 47 детей и сохранялись у 5 (10,4%) из 48 обследованных в динамике забо-

левания (табл. 1). АТ класса IgG в 1-й сыворотке крови зарегистрированы лишь у 6 (12,8%) из 47 больных, у которых сыворотка бралась на 11-16-й день болезни, в то время как во 2-й сыворотке крови они обнаруживались в 2 раза чаще: у 13 (27,1%) из 48 больных ( $p < 0,05$ ).

Несмотря на то, что первая сыворотка бралась на 2-й неделе болезни, у 6 детей выявлены изолированные IgM-АТ к *M. pneumoniae*, еще у 6 больных – поровну сочетания IgM+IgA или IgM+IgG-АТ и у остальных 3 – сочетания всех 3 классов АТ. Все указанные комбинации обнаруженных АТ к *M. pneumoniae* согласно методическим рекомендациям, прилагаемым к коммерческим наборам, могут трактоваться как острая или ранняя стадия МИ [11].

Несомненно, больший интерес представляют результаты индивидуального анализа динамики выявления АТ. У всех серопозитивных детей в 1-й сыворотке определялись АТ класса IgM (табл. 2). При анализе 2-й пробы в 3 из 11 случаев с количественной оценкой титра АТ мы имели 3–5-кратное увеличение содержания IgM-АТ (табл. 2, № 2, 6 и 7). У 2 детей произошло небольшое снижение (на 8% от исходного содержания) титра IgM-АТ (на 18-й и 26-й дни болезни) (табл. 2, № 3 и 10). У ребенка, кровь которого была взята на 22-й и 38-й день болезни, содержание АТ класса IgM снизилось с 244 до 172 BU/ml (табл. 2, № 1). В одном случае, упомянутом выше, АТ класса IgM во 2-й сыворотке, взятой через месяц от начала болезни, перестали определяться (табл. 2, № 16). У остальных больных IgM-АТ оставались без изменений.

В 6 из 16 случаев мы наблюдали сероконверсию с появлением или нарастанием содержания во 2-й сыворотке АТ класса IgA и/или IgG (табл. 2, № 2, 4–6, 8 и 10). Следует отметить, что у 3 из 16 детей, имевших АТ класса IgM, АТ IgG не появились во 2-й сыворотке, взятой через 3–4 недели от начала болезни (табл. 2, № 7, 12 и 16).

Динамика АТ к *M. pneumoniae* класса IgA была менее выразительна. В начале заболевания специфические иммуноглобулины этого класса определялись лишь у 6 (12,8%) из 47 больных, а во 2-й сыворотке они также выявлялись в 6 (12,5%) случаях из 48 обследованных, при том что у одного ребенка они перестали определяться, а у другого появились во второй пробе (табл. 2, № 13 и 4 соответственно).

Для выяснения частоты циркуляции сывороточных АТ к *M. pneumoniae* у детей без ВП обследована группа сравнения. У 17,7% детей группы сравнения были выявлены АТ к *M. pneumoniae*, относящиеся к разным классам иммуноглобулинов и их сочетаниям. Так, IgM-АТ обнаружены у 3 (6,6%) детей: изолированные – у одного (2,2%) и в сочетании с IgG – у 2 (4,4%). Частота обнаружения IgM-АТ к *M. pneumoniae* в группе сравнения значительно отличалась от таковой больных ВП (6,6% vs 33,3%,  $p < 0,05$ ). АТ класса IgA выявлены у 2 (4,4%) и еще у 3 (6,7%) детей обнаруживались АТ только класса IgG. Полученные данные о циркуляции АТ к *M. pneumoniae* у детей без респираторных заболеваний, с одной стороны, могут быть признаком инapparантной инфекции (у 6,6% с IgM-АТ), с другой (IgG-АТ) – указывают на следовую иммунологическую реакцию после перенесенной ранее МИ.

Частота выявления АТ класса IgA в первой и второй пробе сыворотки у детей с ВП была значительно выше, чем в группе сравнения (12,8 и 10,4% vs 4,4%,  $p > 0,05$ ), хотя различия не были значимыми.

В то же время частота (12,8%) обнаружения IgG-АТ к *M. pneumoniae* в 1-й сыворотке больных не имела достоверных отличий от частоты их обнаружения в группе сравнения (11,1%,  $p > 0,05$ ), но значительно превышало таковую во 2-й пробе (27,1% vs 11,1%,  $p < 0,05$ ).

Проведенное сопоставление позволило нам с достаточной надежностью подтвердить диагностическую значимость детекции АТ изотипа IgM при острой МИ в отличие от изолированного обнаружения IgG-АТ, которое не является критерием острой МИ.

При диагностике МИ методом ПЦР *M. pneumoniae* обнаружена у 9 (23,7%) из 38 больных в трахеальном аспирате и у 8 (16,7%) из 48 – в мазках из ротоглотки ( $p > 0,05$ ). При сопоставлении частоты обнаружения *M. pneumoniae* при одновременном исследовании двух биоматериалов у 38 больных генетический материал *M. pneumoniae* был несколько чаще обнару-

Таблица 3

Частота выявления АТ классов IgM, IgA и IgG к *M. pneumoniae* у детей с пневмонией

Результат ПЦР	Период исследования	<i>M. pneumoniae</i>						
		сочетания				всего		
		IgM	IgM+IgA	IgM+IgG	IgM+IgA+IgG	IgM	IgG	IgA
ПЦР (+)	1-я проба (n=8)	4	2	1	1	8	2	3
	2-я проба (n=9)	1	0	3	5	9	8	5
ПЦР (-)	1-я проба (n=7)	2	1	2	2	7	4	3
	2-я проба (n=7)	0	2	4	0	6	4	2

жен в трахеальных аспиратах, чем в мазках из ротоглотки: у 9 (23,7%) vs 8 (21%) больных ( $p > 0,05$ ). По совокупным результатам исследования двух биоматериалов методом ПЦР *M. pneumoniae* обнаружена у 9 (18,8%) из 48 детей.

Все дети из группы сравнения оказались отрицательными на *M. pneumoniae* при исследовании мазков из ротоглотки на ДНК в ПЦР, что позволяет усомниться в широкой распространенности бессимптомной персистенции данного возбудителя у детей в эпителии верхних отделов дыхательных путей.

Наибольший интерес представляют результаты сравнительного исследования уровня детекции *M. pneumoniae* с помощью двух методов диагностики – иммунологического (ИФА) и ПЦР.

МИ при исследовании парных сывороток методом ИФА обнаружена у 16 (33,3%) детей, а методом ПЦР – у 9 (18,8%) из 48 больных ВП ( $p > 0,05$ ). Полное совпадение результатов двух методов диагностики отмечено в 9 (56,2%) из 16 случаев серопозитивных вариантов. Среди детей с положительным результатом ПЦР на *M. pneumoniae* МИ подтвердилась иммунологическим ответом с выявлением IgM-АТ во всех случаях (табл. 2), IgA-АТ – у 5 из 9 и IgG-АТ (во 2-й сыворотке) – у 8 из 9 ПЦР-позитивных больных.

Наши данные в значительной степени близки результатам других исследователей, отмечающих совпадение результатов серологической диагностики (ИФА) и молекулярно-генетической (ПЦР) лишь в 50 и 57,1% случаев [7, 13].

В то же время среди 39 ПЦР-негативных больных в 7 случаях были обнаружены серологические маркеры МИ. Из них у 2 детей по совокупности результатов серологического исследования парных сывороток, ПЦР-диагностики и эпидемиологического анамнеза была диагностирована *S. pneumoniae*-инфекция (табл. 2, № 12, 13). Еще 2 детей имели в обеих сыворотках АТ к *M. pneumoniae* классов IgM и IgG без четкой динамики нарастания титров или смены классов специфических иммуноглобулинов, а также отрицательный результат ПЦР (табл. 1, № 9, 11). Кроме того, у одного ребенка (табл. 2, № 16) обнаруженные в 1-й сыворотке АТ класса IgM во 2-й сыворотке перестали определяться и не появились АТ других классов. Анализ этих результатов заставил нас усомниться в острой МИ у 5 из 7 больных и расценить полученные данные как хламидийную инфекцию или ранее перенесенную МИ.

У остальных 2 больных иммунный ответ был направлен одновременно на два возбудителя (*M. pneumoniae* и *S. pneumoniae*), причем у одного была сходная динамика сероконверсии по обоим возбудителям в парных сыворотках, а у второго – отмечен выраженный антительный ответ на *M. pneumoniae* по 3 классам иммуноглобулинов при отсутствии АТ класса IgM на

*S. pneumoniae* (табл. 2, № 9 и 15). Это не позволяет нам в первом случае дифференцировать *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae*-инфекцию, но с большой степенью вероятности диагностировать у второго ребенка МИ.

По результатам наших исследований мы неоднократно отмечали иммуносерологическую связку в антителообразовании одновременно к двум внутриклеточным возбудителям: *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae*. Возможность микст-инфекции в наших случаях мало вероятна, так как по результатам диагностики методом ПЦР мы ни разу не наблюдали положительного результата детекции ДНК одновременно двух патогенов. Данное положение подтверждается также результатами исследований С.А. Рачиной и соавт. (2013), выполненных на взрослом контингенте больных ВП, в которых ко-инфекция *M. pneumoniae*+*S. pneumoniae*, выявленная методом ПЦР, составила всего 5,3% случаев [15].

Частота иммуносерологических сочетаний между *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae*, выявленная при анализе результатов ИФА, составила 10 (62,5%) на 16 серопозитивных на *M. pneumoniae* образцов. Причем она выявлена в сыворотках крови как ПЦР-позитивных, так и ПЦР-негативных пациентов (табл. 2).

Аналогичная закономерность в нашем исследовании наблюдалась и при серологической диагностике *S. pneumoniae*, когда в сыворотке серологически и ПЦР-позитивных больных одновременно обнаруживались АТ разных классов, в т.ч. и IgM к *M. pneumoniae*.

Выявление положительных иммуносерологических реакций одновременно на *S. pneumoniae* и *M. pneumoniae* наблюдали и другие исследователи, которые расценивали их как микст-инфекцию [10, 16]. Однако подобные сочетания положительных серологических реакций, наиболее вероятно, связаны с поликлональной активацией В-лимфоцитов, продуцирующих разнообразные АТ, не связанные с антигеном возбудителя. На это обращали внимание в своих фундаментальных исследованиях G. Viberfeld и E. Granower, а также E. Ruuth и F. Prax [17, 18].

Наращение специфических АТ к антигенам других возбудителей при бактериологически доказанной пневмококковой и гемофильной инфекциях было показано в исследованиях М.А. Улановой и соавт. Авторы рассматривали данный феномен как результат поликлональной стимуляции гуморального иммунитета, а также перекрестно реагирующими антигенами других микробов, что является важнейшим механизмом защиты макроорганизма от ряда условно-патогенных микроорганизмов [19].

Если принять результаты ПЦР-диагностики за «референтные», диагностика МИ только по серологическим маркерам, наиболее часто используемым в клинической практике, в нашем исследовании в 5 (12,8%) из 39 случаев привела

к ложноположительным результатам и лишь в одном (2,6%) – к ложноотрицательному, при том что в одном случае мы затруднились в выборе причинного агента инфекции.

Динамика корреляции антителообразования у пациентов с ПЦР-положительными и ПЦР-отрицательными результатами с анализом классов иммуноглобулинов и их сочетаний также заслуживает внимания (табл. 3). Как нами отмечено ранее, у ПЦР-положительных лиц в 1-й сыворотке преобладали АТ только класса IgM (4 из 8) или в сочетаниях: с IgA (2 из 8), с IgG и с IgG+IgA (по одному случаю). Во 2-м образце одиночные IgM-АТ практически исчезли (8 из 9), отсутствовало также сочетание классов IgM+IgA, но возросло количество сывороток с сочетаниями АТ IgM с IgG: IgM+IgG или IgM+IgA+IgG (8 из 9).

У ПЦР-отрицательных лиц во 2-й пробе число образцов сывороток с сочетанием IgM+IgG-АТ также увеличилось, но отсутствовали 3-компонентные сочетания классов АТ (IgM+IgA+IgG). В сумме число проб сывороток с IgG-АТ не изменилось по сравнению с 1-й пробой.

Таким образом, у больных пневмонией с положительным результатом ПЦР на ДНК *M. pneumoniae* динамика антителообразования при инфекционном процессе носит классическую закономерность с преобладанием АТ класса IgM в острую фазу заболевания (до 16 дней), которая в дальнейшем (в период реконвалесценции) дополняется продукцией IgG-АТ при сохранении ранее синтезированных специфических IgM и IgA. У ПЦР-негативных лиц динамика смены классов АТ менее отчетлива. Следует отметить, что АТ к *M. pneumoniae* класса IgA в оба периода наблюдения регистрировались менее чем у половины ПЦР-позитивных больных и, следовательно, включение их в диагностические критерии имеет низкую ценность.

Полученные в нашем исследовании результаты вступают в противоречие с трактовкой фазы заболевания МИ по сочетанию классов АТ, изложенные в отдельных публикациях, доступных широкому кругу педиатров [16]. Сочетание АТ классов IgM+IgG отнесено к «обострению» МИ, хотя именно такое сочетание АТ, а также комплекс АТ IgM+IgA+IgG классов характерны для 2-го периода инфекции, который в нашем наблюдении отмечен с 17-й по 30-й день болезни. В этот период возрастает синтез АТ IgG класса на фоне еще сохраняющихся или еще продуцирующихся более ранних АТ классов IgM и IgA.

Определенные возражения вызывает также практика диагностики микст-инфекций лишь по серологическим данным, достигающая в упомянутом исследовании с помощью ИФА 82,1% [16].

#### Заключение

Таким образом, констатируя сложности лабораторной диагностики МИ у детей, прове-

денный нами анализ вселяет определенную долю оптимизма. Несмотря на то, что он возможен и необходим лишь при выполнении научных исследований, его практическая польза состоит в возможности сформулировать некоторые важные на наш взгляд правила, позволяющие обеспечить высокую диагностическую значимость лабораторного подтверждения микоплазменной этиологии пневмонии.

Во-первых, выбор метода диагностики должен быть обусловлен продолжительностью заболевания на момент обращения пациента. ПЦР-исследование следует использовать с первых дней заболевания и далее на протяжении всего срока сохранения симптоматики ОРЗ. Серологическая диагностика возможна, начиная с 7-го дня от начала болезни.

Во-вторых, нужно учитывать особенности использованного биологического материала для исследования. При диагностике методом ПЦР инфекции верхних отделов дыхательных путей используется объединенный мазок из носоглотки и ротоглотки. В случае заболевания с поражением нижних отделов дыхательных путей крайне желательно получение и исследование мокроты или аспиратов из трахеи. В этом случае при получении положительного результата ПЦР микоплазменную этиологию пневмонии можно считать установленной. При отсутствии возможности исследования мокроты или аспиратов из трахеи допустимо исследовать мазок из носоглотки и ротоглотки, но при получении положительного результата этиологию пневмонии можно считать лишь предположительно установленной. Отрицательный результат ПЦР при исследовании мазков следует трактовать с осторожностью, особенно при длительности заболевания пневмонией более 2 недель на момент исследования.

Для серологического исследования важно пользоваться надежными тест-системами с количественной оценкой содержания специфических АТ.

Если использовать только серологическую диагностику, для повышения ее достоверности должны исследоваться парные сыворотки крови, первую из которых берут в острой фазе заболевания, но не ранее 7-го дня от начала болезни, а вторую – спустя 2–3 недели.

В практических целях, особенно когда речь идет об уточнении этиологии ВП, мы заинтересованы в тестах быстрой и достоверной диагностики. Этим целям удовлетворяет одновременная детекция МИ на основании определения АТ класса IgM (ИФА) и положительного результата молекулярно-генетического исследования. Подобный подход повышает надежность диагностики МИ и позволяют более точно определить ведущий агент инфекции в случае серопозитивных вариантов одновременно на два возбудителя: *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae*. Наша позиция относительно использования методов



серологической диагностики в сочетании с ПЦР полностью согласуется с мнением других исследователей [9].

К сожалению, на сегодняшний день можно констатировать недостаточность данных о частоте и длительности циркуляции IgM-АТ у условно здоровых детей и частоте инapparантных инфекций, что открывает перспективы для дальнейших исследований.

Повышение достоверности диагностики МИ чрезвычайно важно для обоснованного назна-

чения макролидных антибактериальных препаратов (предпочтительно 16-членных) детям с ВП и приостановления роста устойчивости бактериальных патогенов к данной группе препаратов. Не всегда оправданное назначение макролидов при инфекционных заболеваниях верхних и нижних дыхательных путей уже привело к формированию высокого уровня резистентности *S. pneumoniae* (29%) к макролидным антибиотикам среди детского населения отдельных регионов нашей страны [20].

## Литература

1. Раковская И.В. Микоплазмы – возбудители микоплазменных инфекций человека. В кн.: Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. А.С. Лабинская, Н.Н. Костюкова, С.М. Иванова, ред. М.: БИНОМ, 2010: 964–993.
2. Тартаковский И.С. Современные подходы к диагностике атипичных пневмоний. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2000; 2 (1): 60–68.
3. Хамитов Р.Ф., Пальмова Л.Ю. *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae* инфекции в пульмонологии: актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения. Казань: б.и., 2001: 64 с.
4. Thurman KA, Walter ND, Schwarts SB, et al. Comparison of laboratory diagnostic procedures for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in community outbreaks. Clin. Infect. Dis, 2009; 48: 1244–1249.
5. Harris M, Clarc J, Coote N, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of community-acquired pneumonia in children: update 2011. Thorax, 2011; 66 (6): 548–569.
6. Bradley JS, Byington CL, Shah SS, et al. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the pediatric infectious diseases society and the infectious diseases society of America. Clin. Infect. Dis. 2011; 53 (7): e25–76.
7. Nilsson AC, Bjorkman P, Persson K. Polymerase chain reaction is superior to serology for the diagnosis of acute *Mycoplasma pneumoniae* infection and reveals a high rate of persistent infection. BMC Microbiology. 2008; 8: 93. doi:10.1186/1471-2180-8-93, <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/93>.
8. Spuesens EBM, Fraaij PLA, Visser EG, et al. Carriage of *Mycoplasma pneumoniae* in the Upper Respiratory Tract of Symptomatic and Asymptomatic Children: An Observational Study. PLOS Medicine, 2013; 10 (5): e1001444, [www.plosmedicine.org](http://www.plosmedicine.org)
9. Nir-Paz R, Michael-Gayego A, Ron M, Block C. Evaluation of eight commercial tests for *Mycoplasma pneumoniae* antibodies in the absence of acute infection. Clin. Microbiol. Infect. 2006; 12: 685–688.
10. Esposito S, Blasi F, Bellini F, Allegra L, Principi N. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* infections in children with pneumonia. Eur. Respir. J. 2001; 17 (2): 241–245.
11. Instruction Manual Medac Diagnostika Ltd. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detections of specific Ig antibodies to *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* in human serum. 2009/2010.
12. Dorigo-Zetsma JW, Zaai SAJ, Wertheim-van Dillen PME, et al. Comparison of PCR, Culture, and Serological Tests for Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* Respiratory Tract Infection in Children. J. of Clinical microbiology. 1999; 1: 14–17.
13. Michelow IC, Olsen K, Lozano J, et al. Diagnostic utility and clinical significance of naso- and oropharyngeal samples used in a PCR assay to diagnose *Mycoplasma pneumoniae* infections in children with community-acquired pneumonia. J. Clin. Microbiol. 2004; 42: 3339–3341.
14. Chang HY, Chang LY, Shao PL, et al. Comparison of real-time polymerase chain reaction and serological tests for the confirmation of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children with clinical diagnosis of atypical pneumonia. J. Microbiol. Immunol. Infect. 2013. pii: S1684-1182(13)00068-6. doi:10.1016/j.jmii.2013.03.015.
15. Рачина С.А., Козлов Р.С., Шаль Е.П. и др. Структура бактериальных возбудителей внебольничной пневмонии в многопрофильных стационарах Смоленска. Пульмонология. 2011; 1: 5–18.
16. Савенкова М.С., Савенков М.П., Самитова Э.Р. и др. Микоплазменная инфекция: клинические формы, особенности течения, ошибки диагностики. Вопросы современной педиатрии. 2013; 12 (6): 108–114.
17. Biberfeld G, Granower E. *Mycoplasma pneumoniae* is a polyclonal B-cell activator. Nature. 1976; 261: 238–239.
18. Ruuth E, Prax F. Interactions between mycoplasmas and immune system. Immunol. Rev. 1989; 112: 133–160.
19. Уланова М.А., Падюков Л.Н., Тамоченко В.К. и др. Особенности гуморального иммунного ответа на пневмококк у детей: определение антител в сыворотке крови, плевральной жидкости и слюне. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1990; 2: 55–62.
20. Маянский Н.А., Алябьева Н.М., Иваненко А.М., и др. Бактериальная этиология острого среднего отита у детей до 5 лет: роль *Streptococcus pneumoniae*. Вопросы диагностики в педиатрии. 2013; 5 (3): 5–13.