

Л.К. Катосова¹, Т.В. Спичак¹, С.С. Ким², С.Б. Яцышина³, И.В. Зубкова¹, М.Н. Прадед³

¹ Научный центр здоровья детей РАМН, Москва

² Детская городская поликлиника № 138, Москва

³ Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Этиологическая диагностика острых пневмоний у детей

Контактная информация:

Катосова Любовь Кирилловна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией микробиологии Научного центра здоровья детей РАМН

Адрес: 119261, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2/62, тел.: 8 (499) 134-53-87

Статья поступила: 02.03.2009 г., принята к печати: 17.03.2009 г.

У 17 детей с внебольничной пневмонией с помощью бактериологического, серологического (ИФА) и молекулярного (ПЦР) методов изучена этиология инфекции. Парные сыворотки крови тестировались на антитела классов IgM и IgG к *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydomphila pneumoniae*. Из трахеального аспирата *Streptococcus pneumoniae* был выделен у 7 из 17 (41,2%) больных. *M. pneumoniae* методом ПЦР была обнаружена у 8 (47,1%) детей. Результаты ИФА этих пациентов также показали появление IgG, либо значимое нарастание IgM антител к *M. pneumoniae* в парных сыворотках. У 3-х пациентов с отрицательным результатом ПЦР был выявлен повышенный уровень антител (IgM и IgG) к *M. pneumoniae*, но без динамики их нарастания. *S. pneumoniae* методом ПЦР в трахеальном аспирате не обнаружена, но были выявлены антитела к данному возбудителю, относящиеся к разным классам и без изменений в динамике. Практически у всех серопозитивных на *S. pneumoniae* лиц были выявлены антитела и к *M. pneumoniae*, что затрудняет трактовку атипичной этиологии пневмонии при использовании результатов только серологического метода. Частота выявления антител к *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* в сыворотке крови детей без респираторной патологии составила 17,7 и 15,5% соответственно. Результаты ПЦР на вирусы показали, что вирусы, обнаруженные у 10 из 17 больных пневмонией, чаще ассоциировались с инфекцией, вызванной *S. pneumoniae*, чем *M. pneumoniae*. (Вопросы диагностики в педиатрии. — 2009. — № 2. — С. 27–31).

Ключевые слова: внебольничная пневмония, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, антитела, ПЦР.

L.K. Katosova¹, T.V. Spichak¹, S.S. Kim², S.B. Yatsyshina³, I.V. Zubkova¹, M.N. Praded³

¹ Scientific Center of Children's Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

² Children's municipal polyclinic № 138, Moscow

³ Central research institute of epidemiology Federal Supervision Agency for Customer Protection and Human Welfare, Moscow

Etiological diagnostics of the acute pneumonia in children

Among 17 children with the community-acquired pneumonia, the authors have examined infection etiology by means of bacteriological, serologic (ELISA) and molecular (PCR) methods. Paired blood sera were tested for the IgM and IgG antibodies against *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydomphila pneumoniae*. *Streptococcus pneumoniae* was isolated from the tracheal aspirate in 7 of 17 (41,2%) patients. *M. pneumoniae* was identified by PCR in 8 (47,1%) children, and ELISA results of these patients also showed the appearance of IgG or significant titer-rises of IgM antibodies against *M. pneumoniae* in the paired sera. In 3 patients with negative PCR results, an increased level of IgM and IgG antibodies against *M. pneumoniae* was observed, but without dynamics of their augmentation. The authors failed to identify *C. pneumoniae* in the tracheal aspirate by PCR, yet they revealed antibodies against this pathogen referred to different classes and without much change in dynamics. Almost in all seropositive for *C. pneumoniae* patients, antibodies against *M. pneumoniae* were detected as well. This finding complicates interpretation of the atypical etiology of pneumonia while using the results of a serologic method only. The incidence for identification of antibodies against *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae* in the serum of children without respiratory pathology was 17,7% and 15,5%, respectively. By means of PCR, viruses were indentified in 10 out of 17 patients with pneumonia, and were more often associated with infection caused by *S. pneumoniae*, than *M. pneumoniae*. (Pediatric Diagnostics. — 2009. — № 2. — P. 27–31).

Key words: community-acquired pneumonia, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, antibodies, PCR.

Инфекции нижних дыхательных путей широко распространены как у детей, так и у взрослых и составляют значительную долю среди причин летальности в детской популяции. По данным ВОЗ в Европейских странах пневмония является причиной смерти детей в возрасте до 5 лет в среднем в 12% случаев [1].

Эффективность лечения и исход пневмонии в значительной степени определяются успешностью этиологической диагностики, значимость которой для выбора адекватной антибактериальной терапии является бесспорной. Однако, с помощью рутинной лабораторной диагностики этиологию пневмоний удается установить в 43–85% случаев [2–4].

Трудности этиологической диагностики пневмонии у детей обусловлены ее полиэтиологичностью. Возбудителями инфекции при пневмонии могут быть как типичные бактериальные агенты: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, так и атипичные возбудители: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* и респираторные вирусы. Следует заметить, что вклад каждого из этих инфекционных агентов в этиологию внебольничных пневмоний четко зависит от возрастной группы пациентов [5, 6], а периодически наблюдаемые подъемы заболеваемости внебольничной пневмонией часто обусловлены атипичными возбудителями [5, 7]. В большинстве (8–40%) случаев внебольничной пневмонии выявляют смешанную (бактериальную или вирусно-бактериальную) инфекцию или изолированную вирусную инфекцию (у 14–35% детей) [7].

Лабораторная диагностика инфекций, вызванных атипичными возбудителями, базируется в основном на серологических методах выявления специфических антител к *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae*, а также молекулярном (ПЦР) методе обнаружения возбудителя. Каждый из перечисленных методов имеет преимущества и недостатки (детекция инфекции в анамнезе при серологическом методе и выявление фрагментов ДНК микроорганизмов методом ПЦР). Лишь сочетанное использование 2-х указанных выше методов исследования с большой степенью вероятности позволяет диагностировать острую инфекцию, возбудителями которых являются *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* [8–11].

Целью данной работы явилась этиологическая диагностика внебольничной пневмонии у детей с применением современных методов лабораторного анализа.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

За период с января по октябрь 2008 г. было обследовано 17 детей в возрасте от 1 до 16 лет с рентгенологически подтвержденной внебольничной пневмонией. От каждого пациента получали трахеальные аспираты и мазки из ротоглотки до начала антибактериальной терапии. Кровь для выявления антител к атипичным возбудителям забиралась двукратно с интервалом не менее 2-х нед: на 1–2 нед (с 5-го по 11-й день) и повторно на 15–30-й день от начала заболевания. Трахеальные аспираты исследовались микробиологически для выявления основных этиологически значимых бронхопатогенов. Идентификация выделенных возбудителей инфекции проводилась с помощью культуральных и морфологических характеристик, а также по

биохимическим и иммунологическим свойствам (система ApiNH, bioMerieux, оптохиновый тест, Slidex pneumo-kit, bioMerieux). Чувствительность к антибиотикам штаммов *S. pneumoniae* определяли дисковым методом (диски БИОРАД, Франция) на среде Мюллера–Хинтон с добавлением эритроцитов человека. Интерпретация данных проводилась согласно методическим указаниям МУК 4.2.1890-04. ПЦР-диагностика проводилась с применением разработанных в ЦНИИЭ наборов реагентов на основе ПЦР: для обнаружения *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae* — набор реагентов «АмплиСенс *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydia pneumoniae*-FRT», респираторно-синцитиального вируса (RSV), вирусов гриппа типов А и В, вирусов парагриппа (с идентификацией 1–4 типов), коронавируса (229E, OC43, NL63, HKU), риновирусов, аденовирусов, энтеровирусов, метапневмовируса (Mpv) и бокавируса человека в трахеальных аспиратах и мазках из ротоглотки. Методом ИФА тестировали парные сыворотки на наличие IgM и IgG к *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* с помощью коммерческих наборов (Savyon Diagnostics, Израиль). Согласно рекомендации производителя, положительным результатом при определении антител к *M. pneumoniae* считали уровень IgM ≥ 20 BU/ml, IgG ≥ 10 BU/ml. Положительным результатом при определении антител к *S. pneumoniae* был показатель индекса позитивности образец/контроль $> 1,1$ для IgG и $> 1,5$ для IgM. Группой сравнения служили сыворотки крови от 45 пациентов без признаков острых респираторных заболеваний, поступивших для плановых операций в хирургические отделения. Различия средних значений определяли с помощью *t*-теста Стьюдента и считали их статистически значимыми при $p < 0,05$.

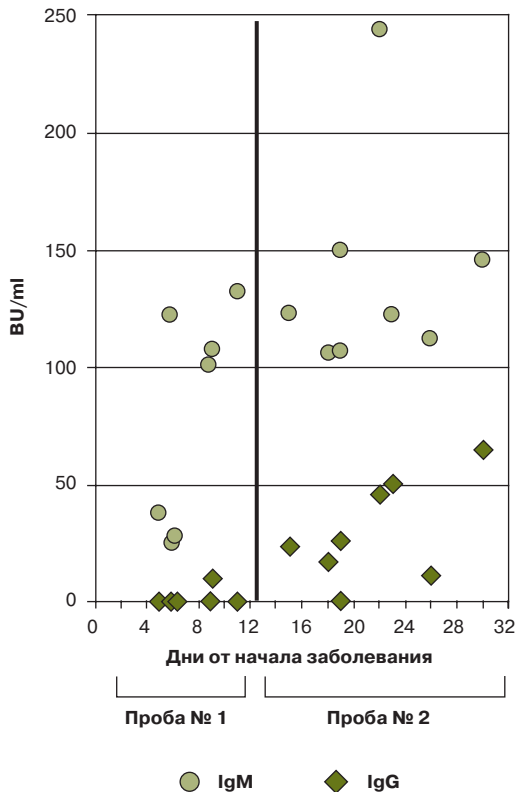
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При микробиологическом исследовании трахеального аспирата *Streptococcus pneumoniae* был выделен у 7 из 17 (41,2%) больных. Только у 1 ребенка пневмококковая инфекция была диагностирована как моноинфекция, у другого больного она сочеталась с *M. pneumoniae* и вирусами, а в остальных 5 случаях наряду со *S. pneumoniae* были обнаружены вирусы. У двух детей из трахеального аспирата выделена *Haemophilus influenzae* (бескапсульная форма). Среди штаммов *S. pneumoniae* 6 из 7 были чувствительны к пенициллину и 1 — слабо чувствителен/резистентен к этому препарату. К эритромицину были чувствительны 5 из 6 штаммов *S. pneumoniae*, к азитромицину — все выделенные штаммы.

Генетический материал *M. pneumoniae* в трахеальном аспирате был обнаружен методом ПЦР у 8 (47,1%) пациентов (в одном случае в ассоциации со *S. pneumoniae* и аденовирусом, обнаруженном в аспирате, и вирусом парагриппа тип 2, обнаруженным в мазке, и в одном случае с энтеровирусом, выявленным в аспирате). Результаты серологического исследования показали, что у всех 8 пациентов с положительной ПЦР на *M. pneumoniae* уже в первой пробе сыворотки, взятой с 5 по 11 день от начала заболевания, обнаруживались антитела класса IgM к антигену этого возбудителя (табл. 1; рис. 1). Кроме того, у 7 из 8 ПЦР⁺-пациентов во второй пробе на 15–30 день от начала заболевания появились IgG антитела к *M. pneumoniae* или существенно увеличилось их содержание (см. рис. 1). Только у

Рис. 1. Динамика содержания антител IgM и IgG к *M. pneumoniae* в сыворотке крови в разные сроки заболевания

В расчет включены данные пациентов с положительной по *M. pneumoniae* ПЦР.



пациента № 2 содержание IgG не изменилось, оставаясь на уровне 46–48 BU/ml. У этого ребенка, кровь которого была взята на 22-й и 38-й дни болезни, отмечено также снижение содержания антител класса IgM с 244 BU/ml до 172 BU/ml.

Как видно из результатов динамического исследования парных сывороток, представленных на рис. 1, антитела к *M. pneumoniae* класса IgM регистрируются уже с 5-го дня заболевания у всех детей с положительной ПЦР. В парных сыворотках отмечался также прирост содержания IgM антител с $79,1 \pm 17,7$ BU/ml в первые 2 нед заболевания до $138,7 \pm 16,9$ BU/ml ($p < 0,05$) — в последующие сроки (см. рис. 1; табл. 2).

Антитела класса IgG в сроки до 2-х нед обнаруживаются редко и начинают выявляться у большинства пациентов лишь с 15-го дня заболевания. Антитела к *M. pneumoniae* класса IgG в первой сыворотке были обнаружены лишь у 1 из 7 пациентов на 9-й день болезни на низком уровне (10 BU/ml). В последующие сроки антитела этого класса регистрировались в сыворотках 7 из 8 (88,9%) детей со средним значением $34,0 \pm 7,5$ BU/ml.

У 3 из 6 пациентов с отрицательной ПЦР, обследованных серологически (№ 6, 15, 16), были выявлены IgM антитела в концентрации ≥ 20 BU/ml в первой пробе, причем у пациента № 15 — в сочетании с появлением низкой

концентрации IgG антител во второй пробе. Содержание антител IgM в парных пробах у всех этих пациентов существенно не менялось, оставаясь в пределах 22–57 BU/ml (см. табл. 1). Отметим, что у всех пациентов с положительной ПЦР уровень IgM к *M. pneumoniae* превышал 100 BU/ml: у № 2, 9, 11, 12, 17 в обеих пробах, у № 8, 13, 14 — во второй пробе (см. табл. 1). Возможно, что предложенный производителем тест-систем уровень cut-off IgM ≥ 20 BU/ml не всегда является специфичным для диагностики острой микоплазменной инфекции у детей, особенно на фоне инфицирования *S. pneumoniae* или сочетанием патогенов, когда возможно развитие поликлональной стимуляции антителогенеза. Так, у пациентов с негативной ПЦР, но IgM ≥ 20 BU/ml был обнаружен Mpv (пациенты № 6 и 15, причем у пациента № 6 — в сочетании со *S. pneumoniae*); у пациента № 16 был выявлен *S. pneumoniae* в сочетании с риновирусом. Примечательно, что пациенты № 15 и 16 имели также повышенный уровень IgG и IgM к *S. pneumoniae* без динамики их нарастания при отрицательном результате ПЦР на *S. pneumoniae*.

S. pneumoniae в трахеальном аспирате и мазке из ротоглотки методом ПЦР не была обнаружена, хотя у 6 пациентов методом ИФА выявлялись антитела к *S. pneumoniae*, относящиеся к разным классам, но без динамики их нарастания. Примечательно, у всех детей, серопозитивных по *S. pneumoniae*, были выявлены антитела и к *M. pneumoniae* (см. табл. 1). Эти данные позволяют думать о том, что у ряда пациентов возможно появление антител к атипичным бактериям в отсутствие клинически значимого очага инфекции, вызванного этими патогенами. Нельзя также исключить вероятность перекрестных реакций. В любом случае, наши данные еще раз подтверждают тот факт, что при диагностике инфекционных заболеваний следует опираться не на результаты отдельных тестов, а на клинико-лабораторную картину в целом.

Данные серологического исследования сывороток, полученных от детей группы сравнения, показали, что антитела к *M. pneumoniae* выявляются с частотой 17,7%, относятся к разным классам иммуноглобулинов и их сочетаниям: только антитела класса IgG выявлены у 3 (6,7%) детей, IgM — 1 (2,2%), IgA — 2 (4,4%) и IgG + IgM — 2 (4,4%). Антитела к *S. pneumoniae* обнаружены у 15,5% детей и принадлежали классу IgM — 3 (6,7%), сочетаниям классов IgG + IgM — 2 (4,4%), а также IgG + IgA — 2 (4,4%).

По результатам ПЦР на вирусы было выявлено, что у 6 пациентов обнаружены вирусы из семейства *Paramyxoviridae*, подсемейства *Pneumovirinae* (RSV и Mpv), причем с большей нагрузкой в трахеальных аспиратах, чем в мазках, либо только в трахеальных аспиратах. Так, RS вирус обнаружен у трех пациентов (в одном случае в ассоциации с *S. pneumoniae*, Mpv — у трех (в 2 случаях в ассоциации с *S. pneumoniae*). У одного пациента обнаружен вирус гриппа А с большим содержанием в мазке, нежели в аспирате (в ассоциации с *S. pneumoniae* и аденовирусом). В одном случае зарегистрирована ассоциация *S. pneumoniae* и риновируса, обнаруженного в аспирате из трахеи (см. табл. 1).

Таблица 1. Результаты лабораторного обследования пациентов с острой пневмонией

Пациенты (пол, возраст)	<i>S. pneumoniae</i>	<i>M. pneumoniae</i>				<i>S. pneumoniae</i>			Вирусы
		ПЦР	ИФА			ПЦР	ИФА		
			IgM (BU/ml)		↑ IgG		IgM	↑ IgG	
			№ 1	№ 2					
1. М, 2 г.	–	–	н/д	н/д	н/д	–	н/д	н/д	RSV
2. Д, 4 г.	+	+	н/д	244	–	–	–	–	Адено, парагрипп-2
3. М, 2 г.	–	–	н/д	н/д	н/д	–	н/д	н/д	RSV
4. Д, 4 г.	+	–	–	–	–	–	–	–	RSV
5. М, 2,5 г.	+	–	н/д	н/д	н/д	–	н/д	н/д	Адено, грипп А
6. Д, 6 л.	+	–	39	22	–	–	–	–	Мрв
7. М, 3,5 г.	+	–	–	–	–	–	–	–	Мрв
8. М, 11 л.	–	+	25	107	+	–	+	–	–
9. Д, 14 л.	–	+	122	106	+	–	–	–	–
10. М, 13 л.	+	–	–	–	–	–	–	–	–
11. М, 3 г.	–	+	108	146	+	–	–	–	Рино, энтеро
12. М, 17 л.	–	+	101	122	+	–	+	–	–
13. М, 6 л.	–	+	38	123	+	–	–	–	–
14. Д, 9 л.	–	+	28	150	–	–	+	–	–
15. Д, 5 л.	–	–	40	49	+	–	+	+	Мрв
16. Д, 7 л.	+	–	57	51	–	–	+	–	Рино
17. Д, 10 л.	–	+	132	112	+	–	+	–	–

Примечание.

М — мальчик, Д — девочка; № 1 и № 2 — содержание IgM в первой и второй сыворотке, соответственно; ↑ IgG — появление или значимое увеличение содержания IgG во второй сыворотке [увеличение расценивали как значимое при (BU/ml во 2-й сыворотке + 15)/(BU/ml в 1-й сыворотке + 15) > 1,55 согласно рекомендации производителя тест-систем]; RSV — респираторно-синцитиальный вирус, Мрв — метапневмовирус; н/д — нет данных.

Таблица 2. Частота обнаружения и показатели содержания антител классов IgM и IgG к *M. pneumoniae* в парных сыворотках крови больных острой пневмонией

Сроки исследования	Положительные IgM			Положительные IgG		
	<i>n</i>	%	BU/ml	<i>n</i>	%	BU/ml
1-я сыворотка (6–14 день)	7/7	100,0	79,1 ± 17,7	1/7	14,3	10,0
2-я сыворотка (15–30 день)	8/8	100,0	138,7 ± 16,9*	7/8	88,9	34,0 ± 7,5

Примечание.

В расчет включены данные пациентов с положительной по *M. pneumoniae* ПЦР.

Данные для BU/ml представлены в виде М ± т.

* — $p < 0,05$.

Полученные результаты (табл. 1) указывают на то, что вирусы чаще были ассоциированы с инфекцией, вызванной *S. pneumoniae* (6 из 7; пациенты № 2, 4–7, 16), чем с *M. pneumoniae* (2 из 8; пациенты № 2, 11). Лишь в одном случае вирусная инфекция сочеталась с двумя

бактериальными возбудителями *S. pneumoniae* + *M. pneumoniae* (пациент № 2).

Таким образом, если принять во внимание результаты всех использованных методов исследования, инфекционные агенты были обнаружены у 100% пациентов.

Пневмококк по-прежнему остается одним из основных этиологических агентов острых пневмоний. В этиологической структуре внебольничной пневмонии выявлен высокий уровень инфекции, вызванной *M. pneumoniae* и подтвержденной двумя методами диагностики.

Исследование показало, что трахеальные аспираты являются наиболее информативным материалом для молекулярной диагностики внебольничной пневмонии, в частности, вызванной *M. pneumoniae*. В случае использования мазков из ротоглотки *M. pneumoniae* была зарегистрирована только в 5 из 8 положительных образцов (по результатам тестирования аспиратов). Высокий процент обнаружения представителей подсемейства *Pneumovirinae* у пациентов с внебольничной пневмонией свидетельствует о необходимости изучения роли этих возбудителей и их ассоциаций с бактериальными агентами в этиологии и патогенезе пневмоний.

Серологическое исследование методом ИФА парных сывороток показало, что для детекции антител к *M. pneumoniae* класса IgM возможно исследование одной пробы сыворотки крови, взятой в 1–2 нед заболевания, поскольку в эти сроки антитела данного класса присутствовали у всех больных с положительным результатом

ПЦР. Выявленные антитела к *M. pneumoniae* классов IgM и IgG у 3-х детей без четкой динамики их нарастания или смены классов специфических иммуноглобулинов при отрицательном результате ПЦР можно трактовать как перенесенную в анамнезе микоплазменную инфекцию. Сложнее объяснить положительные серологические реакции на *S. pneumoniae* (при отрицательной ПЦР) одновременно с обнаружением антител к *M. pneumoniae*. Подобное сочетание наблюдали и другие исследователи [5]. Нарастание специфических антител к антигенам других возбудителей при установленной пневмококковой и гемофильной инфекциях было показано в исследованиях Улановой М.А., полагавшей, что данный феномен может быть обусловлен как поликлональной стимуляцией гуморального иммунитета, так и перекрестно реагирующими антигенами других микробов, что является важнейшим механизмом защиты макроорганизма от ряда условно патогенных микроорганизмов [12].

Примечание.

Авторы выражают признательность д.м.н. Н.А. Маянскому за плодотворную дискуссию и участие в подготовке рукописи настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bulletin of the World Health Organization. — 2008. — V. 86, № 5. — P. 408–416.
2. Покровский В.И., Прозоровский С.В., Малеев В.В. и др. Этиологическая диагностика и этиотропная терапия острых пневмоний. — М.: Медицина, 1995. — С. 272.
3. Wubbel L., Muniz L., Ahmed A. et al. Etiology and treatment of community-acquired pneumonia in ambulatory children // *Pediatr. Infect. Dis. J.* — 1999. — V. 18. — P. 98–104.
4. Juven T., Mertsola J., Waris M. et al. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children // *Pediatr. Infect. Dis. J.* — 2000. — V. 19. — P. 293–298.
5. Катосова Л.К. Условно патогенная флора дыхательных путей и ее роль в этиологии пневмоний / Под ред. В.К. Таточенко. — Чебоксары, 1994. — 323 с.
6. Principi N., Esposito S., Blasi F. et al. Role *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in Children with Community-Acquired Lower Respiratory Tract Infections // *Clinical Infectious Diseases.* — 2001. — V. 32. — P. 1281–1289.
7. Claesson B.A., Lagergard T. Trollfors B. Antibody response to outer membrane of noncapsulated Haemophilus influenzae isolated

from the nasopharynx of children with pneumonia // *Pediatr. Infect. Dis. J.* — 1991. — V. 10. — P. 104–108.

8. Хамитов Р.Ф., Пальмова Л.Ю., Новоженков В.Г. Инфекции, вызываемые *Mycoplasma pneumoniae* // *Антибиотики и химиотерапия.* — 2001. — V. 46, № 4. — С. 29–33.
9. Daxboeck F., Krause R., Wenisch C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection // *Clin. Microbiol. Infect.* — 2003. — V. 9. — P. 263–273.
10. Hammerschlag M. Pneumonia due *Chlamydia pneumoniae* in Children: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment // *Pediatric Pulmonology.* — 2003. — V. 36. — P. 384–390.
11. Esposito S., Bosis S., Faelli N. et al. Role of atypical bacteria and azithromycin therapy for children respiratory tract infections // *Pediatr. Infect. Dis. J.* — 2005. — V. 24, № 5. — P. 438–444.
12. Уланова М.А., Падюков Л.Н., Таточенко В.К. и др. Особенности гуморального иммунного ответа на пневмококк у детей: определение антител в сыворотке крови, плевральной жидкости и слюне // *Микробиология, эпидемиология и иммунобиология.* — 1990. — № 2. — P. 55–62.