

ПРИНЦИПЫ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА, ОБУСЛОВЛЕННЫХ *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE* И *Mycoplasma pneumoniae*, У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Chlamydoiphila pneumoniae и *Mycoplasma pneumoniae* вызывают пролонгированный воспалительный ответ в респираторном тракте, являются этиологическими факторами в 10–60 % случаев внебольничной пневмонии у детей и подростков, ассоциированы с развитием бронхита, фарингита, ларингита, синусита и бронхиальной астмы. Достоверность лабораторной диагностики инфекций респираторного тракта, обусловленных *Chlamydoiphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, у детей и подростков достигается с помощью применения комплекса методов, включающего общеклиническое исследование мокроты, бактериологические, серологические, молекулярно-генетические исследования. Применение современного специфичного и высокочувствительного метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР РВ) представляет собой перспективный способ выявления ДНК *Chlamydoiphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* в целях ранней этиологической диагностики респираторной патологии при условии дифференцированного подхода к выбору биологического материала для исследования и подбору оптимального метода выделения нуклеиновых кислот патогенов. При этом приоритетными становятся методы, позволяющие достичь наиболее глубокого лизиса клеток и элиминировать ингибиторы ПЦР, основными из которых при исследовании образцов биологического материала из респираторного тракта являются гемоглобин, муколитические агенты и полисахариды мокроты. Для терапии хламидиально-микоплазменной инфекции в педиатрии основной группой антибиотиков являются макролиды. В связи с широким применением макролидов для лечения респираторной патологии, вызванной атипичной микрофлорой, в популяции с высокой частотой

от 10 до 90 % регистрируются резистентные к макролидам штаммы *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*. Резистентность к антибиотикам связана с генетическими механизмами. Метод ПЦР РВ применим также для определения генетических факторов резистентности *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* к макролидам в наиболее короткие сроки для коррекции антибактериальной терапии.

Ключевые слова: *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, ПЦР, макролиды, резистентность.

T. V. Hlinkina

PRINCIPLES OF ETIOLOGICAL MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF RESPIRATORY TRACT INFECTIONS CAUSED BY CHLAMYDOMPHILA PNEUMONIAE AND MYCOPLASMA PNEUMONIAE IN CHILDREN AND ADOLESCENTS

Chlamydomphila pneumoniae and *Mycoplasma pneumoniae* cause prolonged inflammatory response in respiratory tract, account for 10–60 % of cases of community-acquired pneumonia in children and adolescents, are associated with the development of bronchitis, pharyngitis, laryngitis, sinusitis and bronchial asthma. The use of a set of methods including general clinical examination of sputum, bacteriological, serological, molecular-genetic studies lets achieve the reliability of laboratory diagnostics of the respiratory tract infections caused by *Chlamydomphila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* in children and adolescents. The application of a modern specific and highly sensitive method of polymerase chain reaction in real time (PCR RT) is a promising way of *Chlamydomphila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* DNA detection for early etiological diagnostics of respiratory pathology. Differentiated approach to the selection of biological material for research and selection of the appropriate method of nucleic acids extraction appear to be the key factors that influence the PCR sensitivity. Methods, which let to achieve the deepest cell lysis and eliminate the PCR inhibitors, such as hemoglobin, mucolytic agents and polysaccharides of sputum, have to be used. Macrolides are the main group of antibiotics for the treatment of chlamydial-mycoplasmal infection in pediatrics. There is a high frequency 10 to 90 % of macrolide resistant strains of *Chlamydomphila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* in population, because of the widespread use of macrolides for the treatment of respiratory pathology, caused by the atypical microflora. Genetic mechanisms determine the antibiotic resistance. PCR RT is applicable to the detection of genetic factors of macrolide resistance of *Chlamydomphila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* in the shortest possible time for the correction of antibacterial therapy.

Key words: *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, PCR, macrolides, resistance.

В структуре первичной заболеваемости детей патология респираторного тракта является наиболее частой 72 % [4]. Большую социальную значимость имеет такой феномен, как затяжные и рецидивирующие заболевания органов дыхания, приводящие к формированию хронической патологии у детей [7]. В данном случае в качестве основных этиологических факторов микробного происхождения рассматриваются *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, которые могут вызывать пролонгированный воспалительный ответ в респираторном тракте [22, 24]. Данные микроорганизмы ассоциированы с развитием бронхита, фарингита, ларингита, синусита, являются этиологическими факторами в 10–60 % случаев внебольничной пневмонии у детей [3, 25]. Получены данные о значительной распространенности инфицирования *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* при бронхиальной астме [36]. Для терапии хламидиально-микоплазменной инфекции в педиатрии основной группой антибиотиков являются макролиды. *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* не чувствительны к β-лактамам антибиоти-

кам [28, 33], которые используются для лечения инфекционного процесса респираторного тракта, обусловленного такими этиологически значимыми в формировании респираторных заболеваний патогенами, как *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, что актуализирует необходимость применения для выявления *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* высоко точного диагностического алгоритма во избежание необоснованного назначения антибактериальных лекарственных средств.

Культуральные исследования, являясь золотым стандартом выявления ряда микроорганизмов не хламидиально-микоплазменной природы, не нашли своего применения для обнаружения *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* в клинической практике. Получение культур данных патогенов – чрезвычайно трудоемкий и длительный процесс: микроорганизмы растут медленно, в среднем 7–14 суток [20, 34, 36]. Для *Mycoplasma pneumoniae* как преимущественно внеклеточного патогена в силу специфичности питательных потребностей требуются для роста специальные среды,

например, SP4, содержащая эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота с обязательным добавлением антибиотика, препятствующего росту сопутствующих микроорганизмов, среда PPLO, дополненная дрожжевым экстрактом, глюкозой и пенициллином [22]. *Chlamydomonas pneumoniae* является внутриклеточным патогеном, поэтому ее рост возможен только в эукариотических клетках, для чего используются специальные клеточные линии (HEp-2 или HL клетки) [20].

Этиологическая микробиологическая диагностика инфекционного процесса респираторного тракта, вызванного хламидиями и микоплазмами, основана на некультуральных методах, а именно иммунологических и молекулярно-генетических исследованиях [36].

Согласно действующему в Республике Беларусь документу «Клинические протоколы диагностики и лечения детей с заболеваниями органов дыхания» методами диагностики бронхитов, эмфиземы легких, пневмонита, бронхолегочной дисплазии, пневмоний у детей при подозрении на инфицирование *Chlamydomonas pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* являются серологические исследования, а именно определение антител классов M, G к антигенам *Chlamydomonas pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* [5].

Преобладающей практикой является однократное серологическое исследование и необходимость быстрой диагностики для назначения лечения. Однако положительный результат однократного серологического исследования не обязательно связан с присутствием в организме *Chlamydomonas pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, поскольку в силу особенностей противохламидийного и противомикоплазменного иммунного ответа антитела класса IgM, как и антитела класса IgG могут определяться еще в течение нескольких месяцев после элиминирования патогенов и прекращения болезни [21]. Оптимальной серологической диагностикой является исследование парных сывороток с целью проследить факт сероконверсии или изменения титров антител, что труднодостижимо в клинической педиатрии. Любое серологическое исследование, проводимое без одновременного использования дополнительного высокочувствительного и высокоспецифичного метода лабораторной диагностики, а также при отсутствии парных сывороток и возможности исследования сероконверсии, носит ретроспективный, а не диагностический характер [17]. Также вероятность обнаружения специфических противохламидийных и противомикоплазменных антител зависит в целом от особенностей образования иммуноглобулинов M, G, A у детей разного возраста и подростков [21].

Поэтому в целях наиболее точного определения этиологической принадлежности *Chlamydomonas pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* к развитию респираторной патологии у детей и подростков целесообразно применять в комплексе несколько методов клинической лабораторной диагностики, какими могут быть серологические исследования и метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) [17, 36]. В этом случае можно выделить принципы этиологической микробиологической диагностики инфекций респираторного тракта, обусловленных *Chlamydomonas pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, у детей и подростков:

1. Использование комплекса лабораторных методов, включающего метод серологической диагностики (ИФА) и метод ПЦР.

Применение современного специфичного и высокочувствительного метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР РВ) представляет собой перспективный способ выявления хламидий и микоплазм в целях ранней этиологической диагностики, а также для контроля эффективности проводимой терапии. ПЦР РВ является лучшей альтернативой традиционной ПЦР, т. к. результаты доступны в течение 4–5 часов в высоко стандартизированном формате без обработки ПЦР продуктов, что снижает риск ложноположительных результатов, которые могут иметь место при манипуляциях с ампликонами [9]. Биологический материал, подходящий для детекции ДНК *Chlamydomonas pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* у детей и подростков, включает мокроту, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), аспират из трахеи, объединенный соскоб эпителиальных клеток из носоглотки и задней стенки глотки, смывы из ротоглотки и полости носа [12, 26, 38].

Одной из особенностей *Chlamydomonas pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* является способность инфицировать различные клетки: респираторного эпителия, альвеолярные макрофаги [24]. *Chlamydomonas pneumoniae* способна переходить из очага первичного инфицирования в респираторном тракте в клетки эндотелия сосудов и гладкомышечные [16], при этом ДНК микроорганизма может не обнаруживаться в клиническом материале из дыхательных путей, тогда как сам патоген присутствует в организме. В данном случае для выявления возможных случаев инфекционного процесса респираторного тракта, обусловленного *Chlamydomonas pneumoniae*, целесообразно дополнять ПЦР РВ серологическими исследованиями. При проведении серологических исследований следует учесть следующие особенности иммунной системы детей: у детей до 3-х месяцев любые детектируемые антитела класса IgG – это антитела матери, в том числе и специфические противомикробные, что может стать источником ложноположительных результатов серологических исследований по выявлению специфических противомикробных антител класса IgG, собственный IgM вырабатывается в этом возрасте в незначительном количестве, составляющем до 20% от уровня взрослого человека. С 3-х месяцев количество собственного IgM нарастает, количество IgG незначительно до года [11]. Определение специфических противохламидийных и противомикоплазменных антител класса IgA не входит в спектр серологических исследований у детей, так как показано, что специфический противомикробный IgA нечасто продуцируется у детей, является короткоживущим и характеризуется реинфицированием, что для детей маловероятно [21].

2. Повышение диагностической чувствительности метода ПЦР в выявлении ДНК *Chlamydomonas pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* путем оптимизации преаналитического этапа и выбора оптимальной системы пробоподготовки.

Преаналитический этап ПЦР включает взятие биологического материала, его хранение, транспортировку и предварительную обработку [8]. Диагностическая ценность метода ПЦР в значительной степени зависит от выбора биологического материала. Для выявления ДНК *Chlamydomonas pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* методом ПЦР предпочтительно исследовать биологический материал из нижних отделов респираторного тракта (мокрота, БАЛ, аспират из трахеи), особенно в случае пред-

полагаемой микоплазменной этиологии пневмоний [12]. *Mycoplasma pneumoniae* адаптирована к существованию в окружении, богатом фосфорными соединениями, которые содержатся в огромном количестве в сурфактанте легких, также основной и уникальный для *Mycoplasma pneumoniae* фактор патогенности CARDS токсин взаимодействует с белком А сурфактанта и аннексином А2 на эпителиальных клетках дыхательных путей, обеспечивая тем самым цитоадгезию патогенна [15, 35]. Наиболее полный рецепторный репертуар, необходимый для цитоадгезии *Mycoplasma pneumoniae* и последующего инфицирования, формируется к периоду морфологической зрелости эпителия респираторного тракта, данный период для человека совпадает с периодом наиболее интенсивного новообразования и дифференцировки ацинусов, а это приблизительно в 2 года жизни. В это же время наиболее интенсивно нарабатывается сурфактант легких [2]. Поэтому в случае инфицирования респираторного тракта ребенка старше 2-х лет *Mycoplasma pneumoniae* данный микроорганизм с наибольшей вероятностью будет обнаружен в мокроте. При невозможности получения биологического материала из нижних отделов респираторного тракта можно исследовать объединенный мазок из носоглотки и задней стенки глотки, что также целесообразно при подозрении на хламидийно-микоплазменную этиологию инфекционного процесса респираторного тракта [12]. *Mycoplasma pneumoniae* является преимущественно внеклеточным патогеном и может удерживаться в пристеночном биотопе верхних отделов респираторного тракта или попадать туда в ходе мукоцилиарного клиренса [39]. Система адгезинов *Chlamydomphila pneumoniae* чрезвычайно разнообразна [29], что позволяет микроорганизму инфицировать клетки как нижних, так и верхних отделов респираторного тракта, поэтому патоген может быть обнаружен как в мокроте, так и в биологическом материале из верхних отделов респираторного тракта.

Для достижения высоких значений диагностической чувствительности метода ПЦР большое значение на преаналитическом этапе имеет качество взятия образца биологического материала для исследования, его хранение, транспортировка и предварительная обработка. В соответствии с рекомендациями по взятию биопроб для ПЦР-диагностики: взятие материала производится из предполагаемого биотопа пребывания микроорганизма; взятие биологического материала, по возможности, должно проводиться до начала антибактериальной терапии; взятие биоматериала для контроля эффективности лечения должно проводиться не ранее чем через 3–4 недели после окончания терапии; количество материала, забираемого для исследования, не должно быть избыточным, т. к. вместе с возбудителем в пробу попадают вещества, которые могут вызывать ингибирование ПЦР или могут способствовать деградации ДНК при хранении и транспортировке; наиболее адекватным инструментом для взятия соскобов и мазков для ПЦР-анализа является специальный зонд (щеточка), который собирает необходимое количество эпителия, не травмируя слизистую, почти не впитывает образец и хорошо отдает собранный материал в жидкую транспортную среду; для взятия биопроб необходимо пользоваться только одноразовым инструментом и одноразовыми пластиковыми контейнерами (или пробирками с транспортной средой) с плотно закрывающейся или завинчивающейся крышкой [8].

После взятия биологического материала он должен быть доставлен в лабораторию в максимально короткие сроки для проведения исследования. До проведения анализа биологический материал может храниться при температуре 2–8 °С – в течение 1 суток, при минус 20 °С – в течение 1 недели, при температуре минус 70 °С – длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Транспортирование клинического материала осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом: при температуре 2–8 °С – в течение 6 часов; в замороженном виде – в течение 1 суток [8].

Если в качестве биологического материала для выявления ДНК *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* используется мокрота или какие-либо другие образцы с вязкой консистенцией, то они должны быть обработаны муколитическим агентом N-ацетилцистеином [8], действие которого связано со способностью свободных сульфгидрильных групп разрывать внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи кислых мукополисахаридов мокроты, что приводит к деполимеризации мукопротеинов и уменьшению вязкости мокроты.

Материал из нижних дыхательных путей, в том числе мокрота, рассматривается как более информативный биологический материал для выявления ДНК *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, однако следует учесть, что в ряде случаев бронхиты и пневмонии хламидийно-микоплазменной этиологии характеризуются малопродуктивным кашлем, при этом спонтанная мокрота продуцируется в незначительных количествах [3]. Важным является проведение контроля качества взятия мокроты, включающего подтверждение получения биологического материала из нижних отделов респираторного тракта, критерием которого является присутствие в образцах легочных макрофагов, и подтверждение отсутствия контаминации мокроты слюной, при этом критерием значительной контаминации является содержание в мокроте плоского эпителия, характерного для ротовой полости, >20% от общего количества клеток [37].

При исследовании клеточного состава мокроты о присутствии атипичной микрофлоры можно косвенно судить по наличию клеток с признаками вакуолизации, фрагментации ядра, что может быть вызвано действием CARDS токсина *Mycoplasma pneumoniae* [15], а также повышенное содержание тучных клеток (норма 0–0,5 %). Тучные клетки обладают свойством поддерживать воспалительный процесс в легких посредством выделения большого количества биологически активных веществ, в том числе тучные клетки являются резервуаром фактора некроза опухоли α . В эксперименте показано, что при инфицировании *Mycoplasma pneumoniae* поддерживаемое тучными клетками воспаление способствует элиминированию микроорганизма [40]. Однако при инфицировании *Chlamydomphila pneumoniae* тучные клетки косвенно способствуют распространению патогена. Тучные клетки вырабатывают фермент химазу (MCP4), которая активирует MMP-9 – основную матричную металлопротеиназу бронхов и легких, которая готовит межклеточный матрикс к миграции клеток, дестабилизируя межклеточные контакты. С помощью данного фермента тучные клетки способствуют расширению межклеточных пространств, прохождению нейтрофилов, макрофагов, которые являются

дополнительным объектом инфицирования для *Chlamydia pneumoniae* [18].

Таким образом, микроскопия мокроты с исследованием клеточного состава оптимизирует преаналитический этап ПЦР, обеспечивая контроль качества взятия мокроты как наиболее информативного биологического материала для исследования на атипичную микрофлору, при этом косвенными признаками инфицирования *Mycoplasma pneumoniae* может быть повышенное содержание тучных клеток в мазке мокроты и наличием патологического фенотипа клеток (вакуолизация, фрагментация ядра), по совокупности данных признаков можно предположить о присутствии патогена до проведения этиологической диагностики.

Существенное влияние на диагностическую чувствительность ПЦР оказывает этап пробоподготовки, который включает выделение ДНК из образца биологического материала и устранение ингибиторов ПЦР. Достичь этого можно несколькими способами. Первый способ включает лизис клеток (разрушение физическим или механическим воздействием), ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизацию клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа, центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл. Затем ДНК осаждают из раствора этанолом и после центрифугирования растворяют осадок в буферном растворе. Другим способом является сорбция ДНК из клеточного лизата на гранулах силикагеля в присутствии хаотропных веществ, центрифугирование и последующая элюция ДНК с гранул в раствор (сорбционная экстракция). Для лизиса клеток и денатурации белков часто используется детергент додецилсульфат натрия (SDS) или хаотропный агент гуанидинизотиоцианат. Некоторые производители продают наборы реактивов для выделения ДНК с использованием магнитных частиц, покрытых силикой SiO_2 .

Отдельные коммерческие наборы предусматривают адсорбцию примесей, ингибирующих ПЦР, с помощью ионообменных смол (например, Chelex) [6].

Описаны различные методы экстракции ДНК *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*: 1) разбавление образца 0,9 % хлоридом натрия с последующим добавлением SDS, экстракция фенол-хлороформом и осаждение ацетатом аммония и этанолом; 2) предварительная обработка протеиназой K с последующей экстракцией фенол-хлороформом или фенол-хлороформ-изоамиловым спиртом и осаждением этанолом; 3) экстракция по Boom (сорбционная экстракция) обработанных протеазой или не обработанных образцов; 4) инкубация с Chelex и азидом натрия; 5) обработка ультразвуком или кипячением; 6) экстракция фенол-хлороформ-изоамиловым спиртом с последующей экстракцией эфиром; 7) экстракция фенол-хлороформом и осаждение ацетатом натрия или хлоридом натрия [14, 26].

Качество и чистота выделенных нуклеиновых кислот (НК) относятся к наиболее важным факторам ПЦР анализа. Для того чтобы получить высокоочищенные НК, не содержащие ингибирующих примесей, необходимо использовать наиболее подходящие методы выделения. К возможным примесям, которые могут ингибировать проведение анализа с использованием ПЦР, относятся: SDS, фенол, этанол, изопропанол, ацетат натрия, хлористый натрий, EDTA, гемоглобин, гепарин, мочевины [10].

При исследовании биологического материала респираторного тракта наиболее частыми ингибиторами ПЦР являются: компоненты крови, полисахариды, а также муколитические агенты (N-ацетилцистеин), которые добавляют в мокроту для снижения ее вязкости [23]. Таким образом, физико-химические свойства мокроты оказывают влияние на выбор метода экстракции НК.

Исследования, в которых сравниваются различные методы экстракции ДНК *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, немногочисленные. Abele-Horn и коллеги сравнивали 2 способа экстракции ДНК *Mycoplasma pneumoniae*: лизис клеток с использованием протеиназы K без последующей очистки НК и ДНК экстракция после лизиса фенол-хлороформом с последующим осаждением этанолом. Применение фенол-хлороформной экстракции требовало на один час больше времени и приводило к десятикратному снижению чувствительности. При этом данный метод ориентирован на работу с такими агрессивными веществами, как фенол и хлороформ, и присутствуют стадии центрифугирования и жидкостной экстракции, которые нельзя автоматизировать, что является значительным недостатком [13].

Gnarpe и Eriksson обнаружили, что чувствительность ПЦР в детекции ДНК *Chlamydia pneumoniae* увеличилась при использовании метода экстракции НК, обеспечивающего более глубокий лизис клеток. О глубине лизиса судили по количеству экстрагированной НК в мкг на мкл биологического материала [14].

Maas и Dalhoff оценивали присутствие ингибиторов ПЦР, основными из которых для биологического материала из респираторного тракта являются гемоглобин, полисахариды, в 75 образцах БАЛ при обработке 3 методами. Ингибиторы ПЦР присутствовали в 31 % образцов при экстракции на основе температурного лизиса, в 12 % образцов при использовании протеиназы K. Наиболее эффективно ингибиторы удалялись при использовании метода выделения с использованием СТАВ – бромистого цетилтриметиламмония. Этот метод удобен для удаления полисахаридов, которых много в мокроте и которые отрицательно влияют на чистоту ДНК и, следовательно, на ее качество [27].

Wilson и коллеги исследовали 4 метода экстракции ДНК из культур *Chlamydia pneumoniae*: 1) метод сорбционной экстракции (силика) на основе применения гуанидинизотиоцианата; 2) инкубация с Chelex; 3) экстракция на основе температурного лизиса; 4) использование протеиназы K. Метод, включающий расщепление с протеиназой K, продемонстрировал наибольшую чувствительность. Инкубация с Chelex была менее чувствительна, чем силика-экстракция. В случае применения температурного лизиса отсутствовало выделение ДНК *Chlamydia pneumoniae* из культур [14].

В настоящее время общепризнанным методическим подходом выделения ДНК является сорбционная экстракция, которая, наряду с высокой чувствительностью, характеризуется простотой выполнения. Использование данного метода выделения НК позволяет автоматизировать процесс, что особенно актуально для повышения производительности клинико-диагностических лабораторий. Недостатками сорбционной экстракции является сложность в выделении НК из объектов с малым количеством биологического материала и малой концентрацией НК.

Метод сорбционной экстракции с помощью магнитных частиц представляет собой простой и надежный способ очистки НК. Методика выделения включает: 1) лизис НК гуанидинизотиоцианатом, 2) сорбцию НК на магнитных частицах, покрытых аффинным к НК лигандом (например, силикой SiO₂), 3) осаждение НК центрифугированием, стадии промывок, 4) элюцию НК [1, 6].

Особенно подходят для выделения парамагнитные частицы, которые не взаимодействуют друг с другом в отсутствие магнитного поля. Эти частицы приобретают магнитный момент в сильном магнитном поле, но не сохраняют постоянного магнетизма, когда поле отсутствует. Если устранены магнитная агрегация и слипание частиц, то в течение реакции достигается суспензирование частиц и единообразная экстракция нуклеиновых кислот. Преимуществами метода экстракции с помощью магнитных частиц является: большая емкость сорбента, позволяющая выделять большие количества НК; минимизация потерь в ходе выделения ДНК; уменьшение риска перекрестной контаминации за счет того, что весь нуклеиновый материал связывается с сорбентом; высокая чистота конечного продукта. Однако возможны потери продукта вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок. Особенно большое значение это имеет при работе с небольшими концентрациями ДНК микроорганизмов в биологическом образце [1, 6].

Таким образом, при выборе оптимального метода пробоподготовки следует ориентироваться на существующие универсальные методические подходы к выделению НК и принимать во внимание, что в биологическом материале из респираторного тракта может присутствовать много ингибиторов ПЦР (компоненты крови, полисахариды, муколитические вещества). От выбранного метода выделения НК зависит в целом чувствительность ПЦР анализа по выявлению ДНК *Chlamydomorphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* и как следствие достоверность получаемых результатов.

3. Выявление антибиотикорезистентности *Chlamydomorphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* к макролидам.

Лекарственными средствами на первых этапах лечения бронхитов и пневмоний с хламидиально-микоплазменной этиологией у детей и подростков являются макролиды [5]. Данная группа антибиотиков обладает противомикробным, противовоспалительным действием, а именно снижает продукцию провоспалительных цитокинов, которая имеет место при инфицировании *Chlamydomorphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* и является одним из ведущих звеньев патогенеза хламидиально-микоплазменной инфекции [32]. У взрослых лиц препаратами выбора являются тетрациклины и фторхинолоны, однако ни одна из данных групп антибактериальных средств не рекомендуется детям до 7 лет из-за органотоксического действия в отношении костной ткани и зубов [30]. В связи с широким применением макролидов у детей и подростков при пневмониях актуальным является мониторинг циркулирующих *Chlamydomorphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, резистентных к данным антибактериальным лекарственным средствам. Макролиды часто назначаются эмпирически, притом что резистентность *Mycoplasma pneumoniae* к макролидам является в настоящее время проблемой мирового масштаба:

резистентные к макролидам штаммы регистрируются в 90 % случаев в Китае, в более чем в 30 % случаев в Японии, в 8,2 % случаев в США, в Европе данный показатель варьирует от 10 до 26 % случаев [30, 34].

Резистентность к антибиотикам связана с генетическими механизмами. У микроорганизмов обнаружены различные механизмы антибиотикорезистентности, включая мутации в сайтах связывания препаратов, метилирование рибосом, эффлюкс системы и системы инактивации лекарств, механизмы «тушения» действия лекарств [30]. Единственный описанный механизм резистентности *Mycoplasma pneumoniae* к макролидам – мутации в домене V однокопийного 23S рРНК гена. Мутации в данном гене, которые индуцируют сильную резистентность к макролидам, включают транзицию А>G в позиции 2063 и трансверсию А>С в позиции 2064, тогда как резистентность к макролидам низкой степени индуцируется в случае транзиции А>G в позиции 2067 и трансверсии С>G/А в позиции 2617. В результате мутаций затрудняется связывание лекарственного средства с рРНК и ингибирование синтеза полипептидов микроорганизма [30, 32].

Мутации в 23S рРНК гене доминантны, так как в геноме *Mycoplasma pneumoniae* только один рРНК оперон. С биологической точки зрения резистентные к макролидам штаммы *Mycoplasma pneumoniae* могут возникать часто, поскольку даже единичная однонуклеотидная замена способна вызвать резистентность, и в силу небольших размеров генома у микроорганизма ограничена система ДНК репарации. Также в развитие антибиотикорезистентности может вносить вклад то, что период полураспада макролидов в организме длительный, особенно азитромицина [19].

Предположительно, резистентность к макролидам формируется у пациентов с *Mycoplasma pneumoniae* в ходе терапии, трансмиссия резистентных штаммов маловероятна [19]. В исследовании Dumke et al. (2014) описан случай появления резистентной к макролидам субпопуляции *Mycoplasma pneumoniae* у одного пациента в ходе лечения. В данной работе исследователи клонировали ПЦР ампликоны 23S рРНК в плазмиду, отбирали колонии и осуществляли секвенирование для идентификации генотипа, присутствующего в образце. При этом только чувствительные субпопуляции *Mycoplasma pneumoniae* определялись в образцах, собранных в 1-й день терапии макролидами, смесь чувствительных и резистентных субпопуляций определялась на 18-й день и позже. С использованием данного метода резистентные квазивиды *Mycoplasma pneumoniae* (полиморфные популяции одного вида микроорганизма), содержащие А2063G или А2064G мутации (46 и 28% соответственно), были идентифицированы в одном и том же образце наравне с диким генотипом 26 %. Для использования в рутинной клинической практике метод, описанный в исследовании, громоздкий и затратный по времени [19].

Используемые методы выявления резистентности к макролидам *Mycoplasma pneumoniae* включают фенотипические методы (тесты на чувствительность), позволяющие определять МИК лекарственных средств, и генотипические методы, выявляющие специфические точечные мутации, приводящие к резистентности к макролидам *Mycoplasma pneumoniae*. Мутации могут детектироваться ПЦР исследованием 23S рРНК гена *Mycoplasma pneumoniae*: метод полиморфизма длин рестрикционных

фрагментов (RFLP), комбинирование ПЦР РВ с высокочувствительным анализом кривых плавления (HRM-анализ) с последующим проведением ДНК секвенирования для подтверждения [31].

Высокая частота инфицирования респираторного тракта детей и подростков *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* до 65 % свидетельствует о значительном распространении и необходимости совершенствования методических подходов к раннему выявлению данных микроорганизмов. Культивирование *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* является длительным процессом, занимающим до трех недель. Специфические противохламидийные и противомикоплазменные антитела детектируются спустя несколько недель после инфицирования, их уровни остаются в пределах чувствительности серологических тестов и после элиминирования патогенов из организма. Достоверность диагностики инфекционного процесса респираторного тракта, ассоциированного с *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, у детей и подростков может быть достигнута с помощью применения комплекса методов клинической лабораторной диагностики, включая методы общеклинического исследования биологического материала из нижних дыхательных путей (мокроты), бактериологические, серологические, молекулярно-генетические исследования. Смешанный характер заболеваний препятствуют выявлению основного этиологического агента, вызвавшего инфекционный процесс, затрудняя тем самым проведение этиотропной противоиной терапии. Использование высокочувствительного и высокоспецифичного молекулярно-генетического метода ПЦР РВ может решить патогенетически значимую задачу выявления *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* при условиях дифференцированного подхода к выбору биологического материала для проведения ПЦР диагностики, а также подбора оптимального алгоритма пробоподготовки. Из всех видов биологического материала респираторного тракта, которые применяются для выявления ДНК *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* методом ПЦР, мокрота рассматривается как наиболее информативный биологический материал, поэтому существенным на преаналитическом этапе ПЦР является проведение контроля качества взятия мокроты. Для выделения нуклеиновых кислот мокрота может использоваться только после предварительной обработки муколитическими агентами, которые снижают ее вязкость, обусловленную присутствием большого количества полисахаридов. В свою очередь муколитические агенты, как и полисахариды мокроты, являются ингибиторами ПЦР, поэтому при выборе метода выделения нуклеиновых кислот из мокроты следует ориентироваться на методы, которые обеспечивают наиболее полное элиминирование муколитических агентов и полисахаридов. Метод ПЦР РВ применим также для определения генетических факторов резистентности микроорганизмов к макролидам – основным лекарственным средствам антибактериальной терапии респираторного хламидиоза и микоплазмоза у детей и подростков. Актуальным является выявление *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* с последующим контролем наличия мутаций, обуславливающих резистентность патогенов к макролидам, в наиболее короткие сроки для коррекции антибактериальной терапии, что может быть достигнуто

применением молекулярно-генетического метода ПЦР РВ. Таким образом, применение современного метода ПЦР РВ в комплексной этиологической микробиологической диагностике инфекций респираторного тракта, обусловленных *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, у детей и подростков позволяет оптимизировать лечение, проводить мониторинг течения заболевания и контролировать излеченность пациента.

Литература

1. Антонова, О. С. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (обзор) / О. С. Антонова [и др.] // Научное приборостроение. – 2010. – Т. 20, № 1. – Р. 3–9.
2. Блохин, Б. М. Заболевания органов дыхания у детей. – М.: ИД «МЕДПРАКТИКА-М», 2007. – 616 с.
3. Жерносек, В. Ф. Острая пневмония у детей: лечение, профилактика / В. Ф. Жерносек, К. К. Орынбасарова, Ш. К. Батырханов – Минск: БелМАПО, 2013. – 51 с.
4. *Здравоохранение в Республике Беларусь*: офиц. стат. сб. за 2015 г. – Минск: ГУ РНМБ, 2016. – 281 с.: табл.
5. *Клинические протоколы диагностики и лечения детей с заболеваниями органов дыхания*: Приложение 1 к Приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 27 декабря 2012 г. № 1536.
6. Костюк, С. А. Теоретические и прикладные вопросы применения методов анализа нуклеиновых кислот: монография / С. А. Костюк [и др.] – Минск: БелМАПО, 2014. – 272 с.
7. Мизерницкий, Ю. Л. Пульмонология детского возраста: проблемы и решения / Ю. Л. Мизерницкий, А. Д. Царегородцева. – М., 2004. – Выпуск 4. – 256 с.
8. *Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности*: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 51 с.
9. Силич, Т. В. Разработка и апробация технологии ПЦР в режиме реального времени для одновременной количественной детекции *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* в клиническом материале от детей и подростков / Т. В. Силич, С. А. Костюк, О. С. Полуян // Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2006. – № 5. – С. 86–88.
10. Сомма, М. Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов. Сессия 4. Выделение и очистка ДНК. – М., 2006. – Вып. 4. – 20 с.
11. Титова, Н. Д. Развитие системы иммунитета плода, новорожденного и детей раннего возраста / Н. Д. Титова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2007. – № 4. – Р. 38–46.
12. Хулуп, Г. Я. Сравнительная характеристика диагностической ценности использования различного биологического материала для определения хламидийно-микоплазменной этиологии воспалительных процессов верхних дыхательных путей и пневмоний у детей и подростков методом ПЦР / Г. Я. Хулуп [и др.] // Материалы VIII съезда педиатров Республики Беларусь. – Минск, 2006. – С. 475–477.
13. Abele-Horn, M. Molecular approaches to diagnosis of pulmonary diseases due to *Mycoplasma pneumoniae* / M. Abele-Horn [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1998. – Vol. 36. – P. 548–551.
14. Allegra, L. *Chlamydia pneumoniae: the lung and heart* / L. Allegra, F. Blasi. – Milan: Springer, 1999. – 205 p.
15. Balish, M. F. Potential molecular targets for narrow-spectrum agents to combat *Mycoplasma pneumoniae* infection and disease / M. F. Balish, S. L. Distelhorst // Front Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – Article 205.
16. Blasi, F. *Chlamydia pneumoniae* and chronic bronchitis: association with severity and bacterial clearance following treatment / F. Blasi [et al.] // Thorax. – 2002. – Vol. 57. – P. 672–676.

17. Chang, H. Y. 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 / H. Y. Chang [et al.] // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* – 2014. – Vol. 47, № 2. – P. 137–144.
18. Chiba, N. Mast cells play an important role in Chlamydia pneumoniae lung infection by facilitating immune cell recruitment into the airway / N. Chiba [et al.] // *J Immunol.* – 2015. – Vol. 194, № 8. – P. 3840–3851.
19. Diaz, M. H. The evolution of advanced molecular Diagnostics for the detection and Characterization of *Mycoplasma pneumoniae* / M. H. Diaz, J. M. Winchell // *Front Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – Article 232.
20. Dowell, S. F. Standardizing Chlamydia pneumoniae Assays: Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada) / S. F. Dowell [et al.] // *CID.* – 2001. – Vol. 33. – P. 492–502.
21. Dumke, R. Antibody response to *Mycoplasma pneumoniae*: protection of host and influence on outbreaks? / R. Dumke, E. Jacobs // *Front Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – Article 39.
22. Hao, Y. *Mycoplasma pneumoniae* modulates STAT3-STAT6/EGFR-FOXA2 signaling to induce overexpression of airway mucins / Y. Hao [et al.] // *Infect Immun.* – 2014. – Vol. 82, № 12. – P. 5246–5255.
23. Ieven, M. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory / M. Ieven, H. Goossens // *Clinical Microbiology Reviews.* – 1997. – Vol. 10, № 2. – P. 242–256.
24. Kem, J. M. Molecular pathogenesis of chronic *Chlamydia pneumoniae* infection: a brief overview / J. M. Kem, V. Maass, M. Maass // *Clinical Microbiology and Infection.* – 2009. – Vol. 15, № 1. – P. 36–41.
25. Kuźma-Mroczkowska, E. *Mycoplasma pneumoniae* as a trigger for Henoch-Schönlein purpura in children / E. Kuźma-Mroczkowska [et al.] // *Cent Eur J Immunol.* – 2016. – Vol. 40, № 4. – P. 489–492.
26. Loens, K. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections / K. Loens [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, № 11. – P. 4915–4923.
27. Maass, M. Comparison of sample preparation methods for detection of Chlamydia pneumoniae in bronchoalveolar lavage fluid by PCR / M. Maass, K. Dalhoff // *J. Clinical. Microbiology.* – 1994. – Vol. 32, № 10. – P. 2616–2619.
28. Medjo, B. *Mycoplasma pneumoniae* as a causative agent of community-acquired pneumonia in children: clinical features and laboratory diagnosis / B. Medjo [et al.] // *Ital. J. Pediatr.* – 2014. – Vol. 40. – Article 104.
29. Mehlitz, A. Modulation of host signaling and cellular responses by Chlamydia / A. Mehlitz, T. Rudel // *Cell. Communication and Signaling.* – 2013. – Vol. 11. – Article 90.
30. Ou, G. In vitro subminimum inhibitory concentrations of macrolide antibiotics induce macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* / G. Ou [et al.] // *Hippokratia.* – 2015. – Vol. 19, № 1. – P. 57–62.
31. Peuchant, O. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in France directly detected in clinical specimens by real-time PCR and melting curve analysis / O. Peuchant [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2009. – Vol. 64, № 1. – P. 52–58.
32. Principi, N. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*: its role in respiratory infection / N. Principi, S. Esposito // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2013. – Vol. 68, № 3. – P. 506–511.
33. Sandoz, K. M. Antibiotic resistance in Chlamydiae / K. M. Sandoz, D. D. Rockey // *Future Microbiol.* – 2010. – Vol. 5, № 9. – P. 1427–1442.
34. Saraya, T. Novel aspects on the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia and therapeutic implications / T. Saraya [et al.] // *Front Microbiol.* – 2014. – Vol. 5. – Article 410.
35. Schmidl, S. R. A trigger enzyme in *Mycoplasma pneumoniae*: impact of the glycerophosphodiesterase GlpQ on virulence and gene expression [Electronic resource] / S. R. Schmidl [et al.] // *PLoS.* – 2011. – Vol. 7, № 9.
36. She, R. C. Limited utility of culture for *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* for diagnosis of respiratory tract infections / R. C. She [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48, № 9. – P. 3380–3382.
37. Thulborn, S. J. Investigating the role of pentraxin 3 as a biomarker for bacterial infection in subjects with COPD / S. J. Thulborn [et al.] // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2017. – Vol. 12. – P. 1199–1205.
38. Wang, M. Clinical and laboratory profiles of refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children / M. Wang [et al.] // *Int. J. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 29. – P. 18–23.
39. Xiao, L. Comparative genome analysis of *Mycoplasma pneumoniae* / L. Xiao [et al.] // *BMC Genomics.* – 2015. – Vol. 16, № 1. – Article 610.
40. Xu, X. Mast cells protect mice from *Mycoplasma pneumoniae* / X. Xu [et al.] // *Am J. Respir. Crit. Care Med.* – 2006. – Vol. 173, № 2. – P. 219–225.