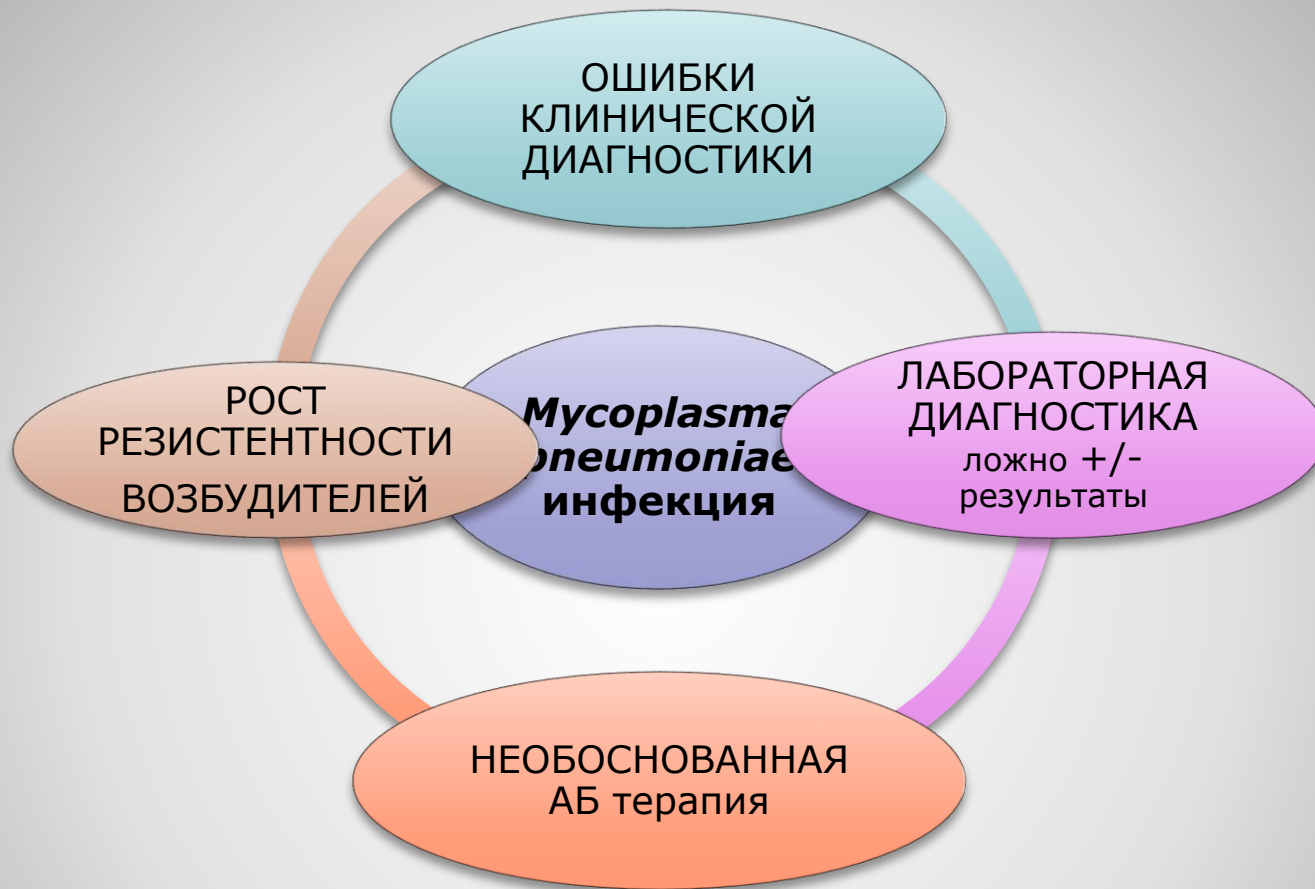


# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ И ОПРЕДЕЛЕНИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКОПЛАЗМ К АНТИБИОТИКАМ

**Спичак Т.В.**

Кафедра педиатрии и детской ревматологии  
педиатрического факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ  
им. И.М. Сеченова Минздрава России

**МОСКВА, 1 февраля 2018 г.**



**ПРОБЛЕМЫ  
ДИАГНОСТИКИ И МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИИ  
И РОСТА УСТОЙЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ**

## **ЦЕЛЬ СООБЩЕНИЯ -**

**практические вопросы, связанные с диагностикой и лечением микоплазменной инфекции, и современные возможности молекулярной диагностики в их решении**



- Отсутствует ригидная клеточная стенка
- Прикрепляются к клеткам человека с помощью tip-органелл
- Способны длительно персистировать

## Особенности микоплазм

# ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

## Частота *Mycoplasma pneumoniae* инфекции в разных возрастных группах

Авторы	Год исследования	Методы	Возраст	Частота М. рп. (%)
Almasri M, Diza E, Papa A, et al.	2011		<1 года	<b>9,8</b>
			1-2 года	<b>21,1</b>
			3-6 лет	<b>44,4</b>
			>7 лет	<b>61,6</b>
Chalker V, Stocki T, Litt D, et al.	2011-2012	<b>ПЦР</b>	<5 лет	<b>1,6</b>
			5-14 лет	<b>14,3</b>
Gadsby NJ, Reynolds AJ, McMenamin J, et al.	2010-2011	<b>ПЦР</b>	<5 лет	<b>29</b>
			5-9 лет	<b>18</b>
Gadsby NJ, Reynolds AJ, McMenamin J, et al.	2010-2011	<b>ИФА</b>	0-4 года	<b>10,4</b>
			5-9 лет	<b>18</b>

# ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

- Тенденция к преобладанию заболеваемости микоплазменной инфекцией летом
- Цикличность эпидемической активности, (интервалы 3-7 лет)

## **Предположение, объясняющее цикличность эпидемий**

Смена P1 подтипов (subtype I и subtype II) микоплазм, выделенных на основе различий в повторении элементов RepMP2/3 и RepMP4 в гене протеина P1 при секвенировании

Spuesens EB, et al., 2009  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.028506-0>

# ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

ФАКТЫ	ЧАСТОТА	АВТОРЫ
Изолированное поражение ВДП наблюдается реже, чем одновременно ВДП и НДП	35,2%  64,8%	Nir-Paz R., 2015
В клинической картине более типичны трахеобронхиты, однако ВП имеет более важное значение	4-8% (вне эпидемий) 20-40% (при вспышках)	Jacobs E, Ehrhardt I, Dumke R, 2015 Loens K, Goossens H, Ieven M, 2010

# КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МИКОПЛАЗМЕННОЙ ПНЕВМОНИИ

- Острое начало
- Фебрильная температура
- Общее состояние - нетяжелое
- Нет выраженной интоксикации и дыхательной недостаточности
- Сухой навязчивый коклюшеподобный кашель
- При аускультации ослабленное дыхание, обильные мелкопузырчатые и крепитирующие хрипы с преобладанием в зоне пневмонической инфильтрации
- В общем анализе крови редкий и невысокий лейкоцитоз



# ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

**Кокрейновский обзор,**  
включивший 7 исследований  
(1491 госпитализированных больных)

## **ВЫВОДЫ**

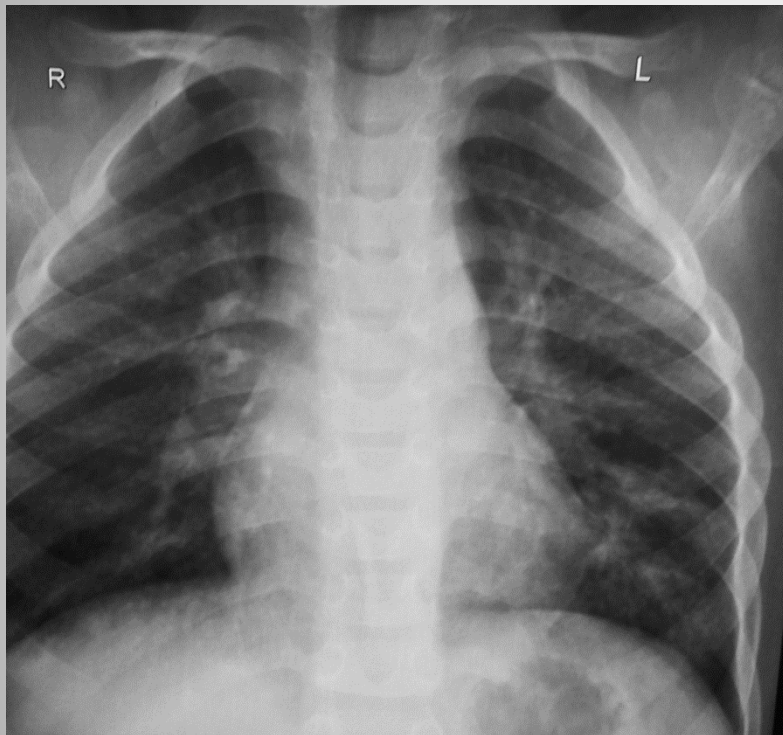
вероятность микоплазменной инфекции при пневмонии

- больше при наличии легочной крепитации, чем при бронхиальной обструкции
- удваивается при боли в грудной клетке

Wang K, Gill P, Perera R, Thomson A, 2012

## **Микоплазменная ВП**

**в лингулярных сегментах ЛЛ**



## **Пневмококковая ВП**

**в лингулярных сегментах ЛЛ**



## **ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ**

Рентгенологически невозможно определить этиологию пневмонии

# МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДЕТЕКЦИИ *M. pneumoniae*

МЕТОД	ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ	ПРИМЕЧАНИЕ
Бактериологический	нет	необходимы особые среды, длительный рост возбудителя (2-3 недели)
Иммунологический с определением специфических АТ (ИФА)	да	Наличие отечественных тест-систем Быстрое получение ответа
Иммунологический с обнаружением АГ <i>M. pneumoniae</i> с помощью РИФ с использованием тест-систем на основе моно-клональных АТ	редко	Не доступен многим лабораториям Имеет узкий временной диапазон (10 дней от начала болезни)

# НЕДОСТАТКИ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО (ИФА) МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ

ОСОБЕННОСТИ АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЯ	АВТОРЫ
Позднее (после 7 дня) появление IgM АТ: 1 нед.- 21%, 2 нед.- 56%, 3 нед.- 100%	Nilsson A.C, Björkman P. and Persson K., 2008
Недостаточный антительный ответ у детей первых лет жизни	
Зависимость частоты обнаружения IgM АТ от используемых тест-систем	Ieven M. and K. Loens, 2013
Длительность циркуляции IgM АТ после инфекции: 6-7 нед., иногда – до 4 мес.	<i>Раковская И.В., 2010</i>
Обнаружение IgM АТ у 24%-60% бессимптомных детей 12-18 лет	Nir-Paz R, Michael- Gayego A, Ron M and Block C., 2006

# ДОСТОВЕРНОСТЬ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ (ИФА) ДИАГНОСТИКИ

СЫВОРОТКИ	ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ (%)	СПЕЦИФИЧНОСТЬ (%)	АВТОРЫ
<b>Сыворотка острой фазы</b> (после 7 дн.)	<b>62</b>	<b>52</b>	Thurman KA, Walter ND, Schwartz SB, et al., 2009
<b>Парные сыворотки</b> (после 7 дн. с интервалом 10-14 дн.)	<b>60-80</b>	<b>90-100</b>	Chang H.Y., Chang L.Y., Shao P.L., et al., 2013

## ПРЕИМУЩЕСТВА ПЦР-ДИАГНОСТИКИ

- Достаточно одного образца для исследования
- Положительный ответ при микоплазменной инфекции возможен с 1-ого дня болезни
- Отрицательный результат ПЦР-диагностики, как правило, исключает микоплазменную инфекцию

## Воспаление ВДП

- Предпочтительны орофарингеальные мазки по сравнению с назофарингеальными аспиратами
- Использование биоматериала из 2-локусов (рино- и орофарингеальные мазки) повышает диагностическую значимость ПЦР

Waites KB et al, 2017  
Michelow IC, et al, 2004

## Пневмония

- Мокрота или трахеальные аспираты являются более информативным биоматериалом, чем рино- и орофарингеальные мазки

Loens K., L.Van Heirstraeten, S. Malhotra-Kumar, 2009  
Спичак Т.В., Катосова Л.К., С.Б Яцышина, и др., 2014

# ВЫБОР БИОМАТЕРИАЛА ДЛЯ ПЦР

## ПРЕИМУЩЕСТВА ПЦР-ДИАГНОСТИКИ

- **Real-time PCR** обеспечивает максимальную чувствительностью (85-95%), специфичность (>90%) и контаминационную безопасность метода



## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ПОЗИТИВНОЕ ПРЕДСКАЗАТЕЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ (PPV) ПЦР В СРАВНЕНИИ С ДРУГИМИ МЕТОДАМИ ИССЛЕДОВАНИЯ при *M. pneumoniae* ИНФЕКЦИИ

МЕТОДЫ СРАВНЕНИЯ		ПЦР		АВТОРЫ
		Диагнос тическая специфично сть (%)	PPV (%)	
<b>ПЦР</b>	Культуральный	<b>100</b>	<b>100</b>	Dorigo-Zetsma JW et al., 1999
	Тест на основе фиксации комплемента	<b>100</b>	<b>100</b>	
	Серологическая диагностика (ИФА) M.pn	<b>97,6</b>	<b>92,3</b>	Michelow IC et al., 2004

# СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО (ИФА) МЕТОДА И ПЦР ДИАГНОСТИКИ *M. pneumoniae* ИНФЕКЦИИ

Авторы	Год	Совпадение результатов ИФА и ПЦР (в %)
Nir-Paz R, Michael-Gayego A, Ron M, Block C.	2006	<b>50,0</b>
Nilsson AC, Bjorkman P, Persson K.	2008	<b>57,1</b>
Chang H.Y., Chang L.Y., Shao P.L., 2013	2013	<b>52,3</b>
Спичак Т.В., Катосова Л.К., Яцышина С.Б., Ким С.С.	2015	<b>56,2</b>

# ПЦР-ДИАГНОСТИКА *M. pneumoniae* ИНФЕКЦИИ

ПРИЗНАК	СРОКИ	АВТОРЫ
Максимальная диагностическая чувствительность обнаружения ДНК <i>M. pneumoniae</i>	<b>1-21 день</b>	Nilsson A.C, Björkman P. and Persson K., 2008
Длительность сохранения ДНК <i>M. pneumoniae</i> в мазках из носо- и ротоглотки	<b>4-7 недель</b>  2-3 мес. (в отдельных случаях)	Spuesens E.B.M., Fraaij P.L.A., Visser E.G., et al., 2013

# ЧАСТОТА ДЕТЕКЦИИ ДНК *M. pneumoniae* В МАЗКАХ ИЗ РОТОГЛОТКИ УСЛОВНО- ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ

АВТОРЫ	ГОД	ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ	
		Условно здоровые дети (%)	Больные (ОРЗ*/пневмония**)
Nilsson AC, Vjorkman P, Persson K, et al.	2008	<b>0,4</b>	29*
Катосова Л.К., Спичак Т.В., Ким С.С., Яцышина С.Б.	2009	<b>0</b>	18,8**
Palma SC, Martinez TM, Salinas SM, et al.	2013	<b>2,2</b>	
Spuesens E.B.M., Fraaij P.L.A., Visser E.G., et al.	2013	<b>21</b>	<b>16*</b>
Centor RM, Atkinson TP, Ratiff AE, et al.	2015	<b>0</b>	

# Carriage of *Mycoplasma pneumoniae* in the Upper Respiratory Tract of Symptomatic and Asymptomatic Children: An Observational Study

*Spuesens E.B.M., Fraaij P.L.A., Visser E.G., 2013*

- Частота обнаружения ДНК *M. pneumoniae* у бессимптомных детей по сравнению с симптомными составила **21% vs 16%**
- Отмечена изменчивость частоты носительства при взятии образцов для исследования в разные сезоны и годы: 3% весной 2009г. и **58%** летом **2011г.** (эпидемический подъем микоплазменной инфекции)
- **Высокая частота обнаружения ДНК *M. pneumoniae* у бессимптомных детей была связана с иннаппарантным инфицированием**
- Специфический иммунный ответ у бессимптомных детей не отличался от ответа детей с симптомами ОРЗ и обнаруженной ДНК *M. pneumoniae* по уровню IgM АТ и доле положительных сывороток

## СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИИ

- Высокая вероятность диагностических ошибок при использовании серологической диагностики одиночной сыворотки острой фазы, редкое носительство *M. pneumoniae* среди бессимптомных детей и относительно короткий (+/-7 нед.) период персистенции возбудителя свидетельствуют:
- ПЦР-диагностика превосходит серологическую в ранней фазе микоплазменной инфекции
- Одновременное использование двух методов исследования (ПЦР и серологического) с обнаружением IgM АТ и ДНК возбудителя позволяет выявить большинство случаев микоплазменной инфекции

*Ieven M. 2015 <https://www.escmid.org/ESGMI>*

## ПРОБЛЕМА

- **Рост резистентности бактериальных возбудителей к антимикробным препаратам**

# РЕЗИСТЕНТНОСТЬ

## *M. pneumoniae* К МАКРОЛИДАМ

СТРАНА	РЕЗИСТЕНТНОСТЬ (%)
Южная Корея	<b>56</b>
Китай	<b>&gt;90</b>
Тайвань	<b>12-23</b>
Германия	1,2-3,6
Дания	1-3
Словения	1,7
Италия	<b>26</b>
Израиль	<b>30</b>
США	1,6- <b>27</b>

*Bebear C., 2015, <https://www.escmid.org/ESGMI>*



# МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ МИКОПЛАЗМ К МАКРОЛИДАМ

- Метилирование участка 23SpPHK субъединицы рибосомы (**MLS<sub>B</sub>-фенотип резистентности**)
- Наиболее частая специфичная точечная мутация, с которой связана резистентность *M. pneumoniae* к макролидам - **A2063G** (53%-100%)

Pereyre S., Goret J. And Bebear C., 2016

МУТАЦИИ	РЕЗИСТЕНТНОСТЬ	
	Низкий уровень	Высокий уровень
	<b>C2617</b>	<b>A2063</b> <b>A2064</b>

Waites KB., Lysynyansky I., Bebear C.M., 2014

# ВЫЯВЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К МАКРОЛИДАМ В ГЕНЕ 23SpPНК

## *M. pneumoniae*

(результаты российского исследования)

- Исследованы 146 клинических образцов (111 орофарингеальных мазков и 35 проб мокроты) от больных с бронхитами и пневмонией

### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

- Разработан быстрый и чувствительный метод определения мутаций устойчивости к макролидам в гене 23SpPНК *M. pneumoniae*: ПЦР в режиме реального времени (одноэтапный, не требует манипуляций с продуктами амплификации)
- Метод обеспечивает возможность одновременного выявления мутаций в позициях 2063, 2064 и 2617 гена 23SpPНК и дополнительно дифференцировать замены A2063G и A2064G.
- **Значимые мутации, связанные со снижением чувствительности микоплазм к макролидным антибиотикам, не выявлены**

## КЛИНИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКОПЛАЗМ К МАКРОЛИДАМ

- Сохраняющаяся лихорадка или ухудшение состояния больного с доказанной микоплазменной инфекцией на фоне лечения макролидными препаратами

## ВЫВОДЫ

- В ранней фазе микоплазменной инфекции ПЦР-диагностика превосходит серологическую
- Достоверность лабораторной диагностики микоплазменной инфекции повышается при одновременном использовании двух методов исследования (ПЦР и серологического) с обнаружением IgM АТ и ДНК возбудителя
- Оптимальным материалом для ПЦР-диагностики являются мазки из 2-локусов (рино- и орофарингеальные) при острых воспалительных заболеваниях ВДП, при пневмонии – мокрота и трахеальные аспираты
- Макролидные антибиотики пока остаются основными препаратами для лечения микоплазменной инфекции у детей в России