

УДК 516.24-002-02

МОНИТОРИНГ ЦИРКУЛЯЦИИ РЕДКИХ И ТРУДНОКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ СРЕДИ ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ НИЖНЕГО НОВГОРОДА

© 2012 г. **Е.В. Сперанская, В.Н. Мазепа, Н.Ф. Бруснигина, О.М. Черневская,
М.А. Махова, К.А. Орлова**

Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной

mazepavn@mail.ru

Поступила в редакцию 12.04.2012

За период с 2008 по 2011 гг. обследованы методом ПЦР 384 взрослых и 1001 ребенок с различными воспалительными заболеваниями органов дыхания, а также 127 здоровых детей и 52 здоровых взрослых. Установлена широкая распространенность *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* среди взрослых и *M. pneumoniae* – среди детей старше года с воспалительными бронхолегочными заболеваниями. *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis* встречались в единичных случаях как у взрослых, так и у детей. Выявлена активная репликация вирусов группы герпеса у больных всех возрастных групп.

Ключевые слова: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex I/II*, ПЦР, взрослые, дети.

Введение

Инфекционные воспалительные заболевания органов дыхания – одна из актуальных проблем современного здравоохранения [1, 2]. Поражения органов дыхания могут быть вызваны различными видами бактерий и вирусов, колонизирующими верхние и нижние дыхательные пути. Наряду с традиционными этиологическими агентами (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, вирусами гриппа) большую роль приобретают редкие и труднокультивируемые, такие как *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, бактерии рода *Legionella* [2, 3]. На фоне снижения иммунного статуса населения возрастает роль этих возбудителей в формировании патологии органов дыхания. По данным литературы на долю этих возбудителей приходится от 8 до 30 % случаев заболеваний респираторного тракта, при этом частота их выявления при различных нозологических формах у разных авторов существенно варьирует [4–7].

Следует отметить, что редкие и труднокультивируемые возбудители традиционными методами (бактериологическими, иммунологическими, серологическими) детектируются недостаточно надежно, так как они являются микроорганизмами, требовательными к условиям культивирования, обладают высокой антиген-

ной изменчивостью, поэтому, несмотря на значительные затраты времени и средств, в 60% случаев этиологический фактор установить не удается [2, 8].

Метод ПЦР, широко используемый в настоящее время для детекции большинства инфекционных агентов, является наиболее предпочтительным для выявления редких и труднокультивируемых возбудителей заболеваний органов дыхания, т.к. позволяет исследовать любой биологический субстрат, обладает высокой чувствительностью, специфичностью, скоростью получения результата, возможностью одновременного исследования большого числа проб [2, 7].

Работы, посвященные многолетнему изучению циркуляции широкого спектра возбудителей бронхолегочных заболеваний на различных территориях Российской Федерации, отсутствуют. Достаточно редки публикации по данной проблеме и в зарубежной научной литературе [9–11].

В связи с этим, цель работы – мониторинг циркуляции *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex I/II* среди детей разных возрастных групп и взрослых Нижнего Новгорода с различными воспалительными заболеваниями органов дыхания с использованием метода ПЦР.

Экспериментальная часть

За период с 2008 по 2011 гг. обследованы 1385 пациентов (384 взрослых и 1001 ребенок в возрасте от 15 дней до 16 лет), находившихся на стационарном лечении в городских больницах Н. Новгорода с рентгенологически и клинически подтвержденными диагнозами: внебольничная пневмония, острый бронхит, бронхиальная астма, ОРЗ/ОРВИ.

Контрольная группа состояла из 127 здоровых детей в возрасте от 3 лет до 16 лет и 52 здоровых взрослых в возрасте от 18 лет до 71 года.

Материалом для исследования служили: мокрота, мазки с заднего свода глотки, бронхоальвеолярный лаваж, кровь, у детей первого года жизни при отсутствии мокроты исследовалась слюна.

Исследования осуществляли методом ПЦР: традиционная ПЦР, Real-Time PCR, ПЦР минипулов. Для проведения ПЦР использовали амплификаторы «Терцик МС-2» (ДНК-технология, Москва), «Gene Cycler» (Bio-Rad, США), «My Cycler» (Bio-Rad, США), Rotor Gene 6000 (Corbet Research, Австралия).

Выделение ДНК проводили наборами «ДНК-сорб А», «ДНК-сорб Б» разработки ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора в соответствии с инструкциями по их применению.

Использовали тест-системы «АмплиСенс» производства ЦНИИЭ (Москва) и GenPak DNA PCR test фирмы «Изоген» (Москва).

Детекцию продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в агарозном геле с последующей регистрацией результатов с использованием программы «Bio-test».

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью методов вариационной статистики, методов оценки достоверности результатов (*t*-критерия Стьюдента). Достоверными считались границы, установленные при вероятности безошибочного прогноза $p < 0.05$. Качественные признаки представлены с указанием стандартной ошибки доли ($\pm m$).

Результаты и их обсуждение.

В ходе исследования нами был разработан оптимальный алгоритм применения метода ПЦР в диагностике воспалительных заболеваний органов дыхания. Его сущность заключается в том, что с целью повышения эффективности выявления инфекционных агентов и снижения себестоимости исследования для ПЦР-

детекции распространенных труднокультивируемых видов возбудителей (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Herpes simplex I/II* типов, *Cytomegalovirus*) воспалительных заболеваний органов дыхания используется смесь субстратов от одного пациента (мокрота, мазки с заднего свода глотки, бронхоальвеолярный лаваж, слюна), а при детекции редких форм возбудителей, частота выявления которых не превышает 5% (*C. psittaci*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis*) формируют минипул из ДНК, выделенной из смеси субстратов от пяти (четырёх, трёх) человек. Образцы крови исследуются отдельно.

Результаты исследований показали, что спектры и частота выявления редких и труднокультивируемых форм инфекционных агентов отличаются в группах больных разных возрастов с различными нозологическими формами заболеваний. При обследовании детей в возрасте до года представители бактериальных агентов не были обнаружены (табл. 1). Возможно, это обусловлено отсутствием контактов с потенциальными источниками инфицирования этими микроорганизмами.

В этой группе часто наблюдалась активная репликация вирусов группы герпеса. Так, частота обнаружения *Cytomegalovirus* при пневмониях составляла 23.6%, при ОРЗ/ОРВИ – 50.5%, при острых бронхитах – 50.7%. *Herpes simplex I/II* чаще обнаруживался у детей с бронхитами и пневмонией – в 2.2 и в 4.6% случаев соответственно; при ОРВИ частота обнаружения *Herpes simplex I/II* составила 0.9%. Такие высокие показатели инфицированности вирусами группы герпеса детей в возрасте до года подтверждают данные литературы о широком распространении этих вирусов в человеческой популяции и о высокой вероятности инфицирования организма герпесвирусами в первые месяцы жизни [12].

У детей в возрасте от 1 года до 16 лет частота выявления редких и труднокультивируемых возбудителей бронхолегочных заболеваний при разных нозологических формах варьировала, хотя спектр возбудителей существенно не отличался. Обращает на себя внимание высокая частота выявления *M. pneumoniae* у детей старше года, больных пневмонией (30.4%). Этот показатель был в 3–4 раза выше, чем при остром бронхите и ОРЗ/ОРВИ, что свидетельствует о доминировании данного возбудителя в этиологической структуре «атипичной» пневмонии, что также согласуется с данными как отечественной, так и зарубежной литературы [3, 5]. Следует отметить, что *C. pneumoniae* в группе

Таблица 1

**Частота выявления (%) редких и труднокультивируемых возбудителей
воспалительных заболеваний органов дыхания у детей**

Возбудитель	Пневмония		Острый бронхит		ОРЗ/ОРВИ		Астма
	дети до 1 года (n = 110)	дети старше 1 года (n = 125)	дети до 1 года (n = 134)	дети старше 1 года (n = 162)	дети до 1 года (n = 107)	дети старше 1 года (n = 231)	дети старше 1 года (n = 132)
<i>M. pneumoniae</i>	0	30.4±4.1	0	8.6±2.2	0	6.1±1.6	6.8±2.2
<i>C. pneumoniae</i>	0	1.6±1.1	0	0.6±0.6	0	0.7±0.5	0
<i>C. psittaci</i>	0	0.8±0.8	0	1.23±0.9	0	0.4±0.4	0
<i>L. pneumophila</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. catarrhalis</i>	0	0	0	0.6±0.6	0	0	0
<i>Cytomegalovirus</i>	23.6±4.0	52.8±4.5	50.7±4.3	52.5±3.9	50.5±4.8	49.4±3.2	40.9±4.27
<i>HSV I/II</i>	4.6±1.2	8.0±2.4	2.2±1.3	5.6±1.8	0.9±1.0	3.5±1.2	2.3±1.3

детей в возрасте от года до 16 лет выявлялась достаточно редко при всех нозологических формах – от 0.6 до 1.6%. Эти данные следует учитывать клиницистам при назначении диагностических исследований.

Обращает на себя внимание высокая частота репликации вирусов группы герпеса при всех нозологических формах: при пневмонии *Cytomegalovirus* обнаруживался в 52.8% случаев, при остром бронхите – в 52.5%, при ОРЗ/ОРВИ – в 49.4%, при астме – в 40.9%; частота выявления *Herpes simplex I/II* в зависимости от нозологической формы варьировала от 2.3% до 8.0%.

При обследовании детей разных возрастов не удалось обнаружить *L. pneumophila* ни при одной из форм патологий. Находки *M. catarrhalis* были единичными – лишь при остром бронхите в группе детей от 1 года до 16 лет. *C. pneumoniae* и *C. psittaci* также выявлялись редко и только в группе детей от 1 года до 16 лет. Частота обнаружения *C. pneumoniae* составила 1.6% при пневмонии; 0.6% при остром бронхите; 0.7% при ОРВИ. *C. psittaci* выявлялась в 0.8% случаев при пневмонии, в 1.23% – при остром бронхите, в 0.4% – при ОРЗ/ОРВИ.

При обследовании детей в возрасте от 1 года до 16 лет с бронхиальной астмой выявлена высокая распространенность *Cytomegalovirus* (40.9%), частота выявления *M. pneumoniae* составила 6.8%.

Обращает на себя внимание высокая частота смешанного инфицирования больных различными формами воспалительных заболеваний респираторного тракта (рисунок). В группе детей от 1 года до 16 лет смешанное инфицирование наблюдалось чаще, чем в группе детей до года. Так, при пневмонии частота смешанного инфицирования составила 31.3% у детей от 1 года до 16 лет и 7.6% у детей до года, при

остром бронхите – 11.1% у детей от 1 года до 16 лет и 1.5% у детей до года, при ОРЗ/ОРВИ – 11.4% у детей от 1 года до 16 лет и 1.9% у детей до года.

Основными вариантами ассоциаций были *M. pneumoniae* и *Cytomegalovirus*; *Cytomegalovirus* и *Herpes simplex I/II* в группе детей от 1 года до 16 лет, и *Cytomegalovirus* и *Herpes simplex I/II* в группе детей до года.

В табл. 2 представлены данные о частоте выявления различных инфекционных агентов у взрослых, больных воспалительными заболеваниями органов дыхания. В связи с тем, что обследованная группа взрослых состояла в основном из пациентов с преобладающим диагнозом внебольничная пневмония, а количество больных с острым бронхитом было незначительным, и частота выявления инфекционных агентов при данных заболеваниях статистически не отличалась, поэтому мы сочли целесообразным объединить их в одну группу.

Таблица 2

**Частота выявления инфекционных агентов
при внебольничной пневмонии
и острых бронхитах у взрослых**

Возбудитель	Частота выявления, %
<i>M. pneumoniae</i>	12.2±1.7
<i>C. pneumoniae</i>	12.0±1.6
<i>M. catarrhalis</i>	2.3±0.8
<i>L. pneumophila</i>	0.5±0.4
<i>C. psittaci</i>	0.3±0.3
<i>Herpes simplex I/II</i>	14.6±1.8
<i>Cytomegalovirus</i>	5.5±1.2

Редкие и труднокультивируемые возбудители были выявлены у 41.7% пациентов.

M. pneumoniae и *C. pneumoniae* обнаруживались с одинаковой частотой – в 12% случаев. Достаточно высокая частота выявления данных

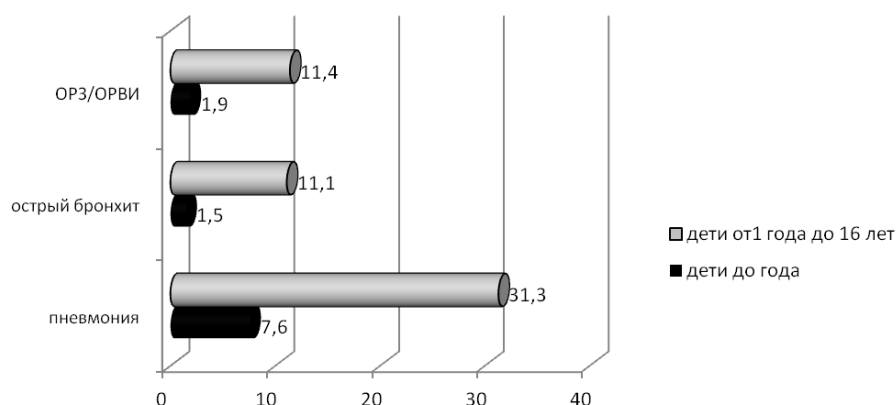


Рис. Частота выявления (%) смешанного инфицирования детей при различных воспалительных заболеваниях органов дыхания

Таблица 3

Частота выявления (%) редких и труднокультивируемых возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания у детей и взрослых, больных пневмонией, и в группах сравнения

Возбудитель	Дети от 1 года до 16 лет		Взрослые	
	больные пневмонией (n = 125)	здоровые (n = 127)	больные пневмонией (n = 384)	здоровые (n = 52)
<i>M. pneumoniae</i>	30.4±4.1	1.6±1.1	12.2±1.7	0
<i>C. pneumoniae</i>	1.6±1.1	0	12.0±1.6	0
<i>M. catarrhalis</i>	0	0	2.3±0.8	1.9±1.9
<i>L. pneumophila</i>	0	0	0.5±0.4	0
<i>C. psittaci</i>	0.8±0.8	0	0.3±0.3	0
<i>Herpes simplex I/II</i>	8.0±2.4	1.6±1.1	14.6±1.8	3.9±2.7
<i>Cytomegalovirus</i>	52.8±4.5	15.0±3.2	5.5±1.2	3.9±2.7

инфекционных агентов у больных по сравнению с контрольной группой подтверждает их этиологическую роль в развитии пневмонии, что согласуется с данными литературы [9, 13].

Как известно, традиционная схема терапии воспалительных бронхолегочных заболеваний, в особенности пневмонии, основана на использовании антибиотиков пенициллинового ряда и является малоэффективной при лечении пациентов, инфицированных *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae*. Поэтому своевременное обследование больных на наличие этих возбудителей необходимо для выбора и назначения адекватной этиотропной терапии [2].

M. catarrhalis была выявлена у 2.3% больных. Следует отметить находки *L. pneumophila* у двух больных, что составило 0.5% от общего числа обследованных. *Cytomegalovirus* выявлялся в 10 и более раз реже, чем в группе больных детей. Однако *Herpes simplex I/II* обнаруживался чаще в группе взрослых (в 14.6% случаев), чем у детей. Вирусы группы герпеса вызывают воспалительные заболевания органов дыхания, как правило у лиц с иммунодефицитами. По-

скольку обследованные нами контингенты не являлись иммуноскомпрометированными лицами, то можно предположить, что активная репликация герпесвирусов, уже имеющихся в макроорганизме и пребывающих в латентной фазе, начинается на фоне ослабления иммунной системы при воспалительных заболеваниях органов дыхания и протекает параллельно с основным инфекционным процессом, осложняя и усугубляя его.

Ассоциации возбудителей встречались у 6.3% взрослых больных с пневмониями и острым бронхитом. Все ассоциации состояли из двух возбудителей. Чаще других встречались следующие ассоциации: *C. pneumoniae* и *Herpes simplex I/II*, *M. pneumoniae* и *Herpes simplex I/II*, *C. pneumoniae* и *Cytomegalovirus*, а также *Cytomegalovirus* и *Herpes simplex I/II*.

При изучении распространенности редких и труднокультивируемых возбудителей в популяции были обследованы здоровые дети и взрослые (табл. 3). *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *L. pneumophila* в группе здоровых детей и взрослых не были обнаружены. *M. pneumoniae* у здо-

ровых взрослых не выделялась, а у здоровых детей выявлялась редко (у 1.6%). *Cytomegalovirus* выявлялся у здоровых детей почти в 4 раза реже, чем у больных, а в группах здоровых и больных взрослых различия были незначительны. Вирус *Herpes simplex I/II* у здоровых детей и взрослых обнаруживался значительно реже, чем у больных.

Сравнительный анализ распространенности труднокультивируемых микроорганизмов среди здоровых лиц и больных детей и взрослых показал достоверное различие в частоте их выявления. В группе здоровых взрослых носительство патогенных форм не обнаружено, однако при обследовании здоровых детей *M. pneumoniae* была выявлена у 1.6%, что согласуется с данными К. Loens et al. [13].

Заключение

Таким образом, установлена широкая распространенность *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* среди взрослых и *M. pneumoniae* – среди детей в возрасте старше года, больных воспалительными заболеваниями органов дыхания. *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis* встречались в единичных случаях как у взрослых, так и у детей. Выявлена активная репликация вирусов группы герпеса у больных всех возрастных групп с воспалительными бронхолегочными заболеваниями, при этом у детей преобладала репликация *Cytomegalovirus*, у взрослых – вируса *Herpes simplex I/II*.

Высокая частота обнаружения труднокультивируемых форм возбудителей, прежде всего *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae*, свидетельствует о целесообразности и необходимости обследования больных с различными нозологическими формами воспалительных заболеваний респираторного тракта на данные виды микроорганизмов с целью назначения эффективной этиотропной терапии.

Список литературы

1. Синопальников А.И., Фесенко О.В., Тихонов Ю.Г. и др. Тяжелая внебольничная пневмония:

этиологическая структура // Антибиотики и химиотерапия. 2001. Т. 46. № 6. С. 6–11.

2. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Страчунский Л.С. Пневмония. М.: МИА, 2006. 464 с.

3. Вишнякова Л.А., Никитина М.А., Петрова С.И. и др. Роль *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae* при внебольничной пневмонии у детей // Пульмонология. 2005. № 3. С. 43–47.

4. Тартаковский И.С. Современные подходы к диагностике атипичных пневмоний // Клинич. микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. № 2. С. 60–68.

5. Baer G., Engelcke G., Abele-Horn M. et al. Role of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* as causative agents of community-acquired pneumonia in hospitalised children and adolescents // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2003. V. 22 № 12. P. 742–745.

6. Gonzales R., Sande M.A. Uncomplicated acute bronchitis // Ann. Intern. Med. 2000. V. 133. P. 981–991.

7. Schneeberger P.M., Dorigo-Zetsma J.W., van der Zee A. et al. Diagnosis of atypical pathogens in patients hospitalized with community-acquired respiratory infection // Scand. J. Infect. Dis. 2004. V. 36. № 4. P. 269–273.

8. Bartlett J.G. Practice guidelines for management of community acquired pneumonia in adults. Guidelines from the infectious diseases of America // Clin. Infect. Diseases. 2000. V. 31. P. 347–382.

9. Tondella M.L., Talkington D.F., Holloway B.P. et al. Development and evaluation of real-time PCR-based fluorescence assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* // J. Clin. Microbiol. 2003. V. 41. P. 4366–4371.

10. Tong C.Y., Sillis M. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in sputum samples by PCR // J. Clin. Pathol. 1993. V. 46. P. 313–317.

11. Welti M., Jaton K., Altwegg M. et al. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2003. V. 45. № 2. P. 85–95.

12. Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. Герпесвирусные инфекции человека. СПб.: СпецЛит, 2006. 303 с.

13. Loens K., Ursi D., Goossens H. et al. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections // J. Clin. Microbiol. 2003. V. 41. P. 4915–4923.

**MONITORING OF THE CIRCULATION OF RARE AND DIFFICULT-TO-CULTIVATE AGENTS
OF INFLAMMATORY RESPIRATORY DISEASES AMONG CHILDREN
AND ADULTS IN NIZHNI NOVGOROD**

***E.V. Speranskaya, V.N. Mazepa, N.F. Brusnigina, O.M. Chernevskaya,
M.A. Makhova, K.A. Orlova***

During the period from 2008 to 2011, 384 adults and 1001 children with various inflammatory diseases of the respiratory system were surveyed by PCR method, along with 127 healthy children and 52 healthy adults. The prevalence of *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae* in adults and *M. pneumoniae* among children over one year old with bronchopulmonary inflammatory diseases was established. *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis* were found in individual cases in both adults and children. Active herpes virus replication in patients of all ages was revealed.

Keywords: Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae, Chlamydophila psittaci, Legionella pneumophila, Moraxella catarrhalis, Cytomegalovirus, Herpes simplex I/II, PCR-method, adults, children.