



Глинкина Т.В.
Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь

Совершенствование молекулярно-генетической диагностики инфекций, обусловленных *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae*

Конфликт интересов: не заявлен.

Подана: 13.04.2022
Принята: 06.06.2022
Контакты: kuklitsk@mail.ru

Резюме

Цель. Усовершенствовать метод выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae* с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на основе выбора оригинальных праймеров и проб для качественной, количественной и дифференциальной диагностики инфекций.

Материалы и методы. Методологический подход включал выбор специфических последовательностей из геномов *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae* для дизайна праймеров и проб, создание положительного контрольного образца, подбор условий амплификации; апробация метода проведена на образцах ДНК, выделенных из соскобов эпителиальных клеток из полости носа, ротоглотки и мокроты детей с бронхитами и пневмониями.

Результаты. Усовершенствован метод на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, характеризующийся высокой аналитической чувствительностью – 10 копий ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae* на реакцию, и специфичностью, составившей 100%.

Выводы. Данный метод позволяет одновременно проводить выявление ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae* и определять концентрацию ДНК *Mycoplasma pneumoniae* в мокроте.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, концентрация ДНК, мокрота



Hlinkina T.

Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Improvement of Molecular Genetic Diagnostics of Infections Caused by *Mycoplasma Pneumoniae* and *Chlamydia Pneumoniae*

Conflict of interest: nothing to declare.

Submitted: 13.04.2022

Accepted: 06.06.2022

Contacts: kuklitsk@mail.ru

Abstract

Purpose. Optimize the detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* by real-time polymerase chain reaction on the base of the choice of original primers and probes for qualitative, quantitative and differential diagnostics of infections.

Materials and methods. The methodological approach included the development of primers and probes specific for genome sequences of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae*, positive control DNA template, polymerase chain reaction conditions; the method was tested on DNA samples isolated from nasopharyngeal swabs and sputum of children with bronchitis and pneumonia.

Results. The optimized method is based on the real-time multiplex polymerase chain reaction, the method's analytical sensitivity is 10 copies of each *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* DNA per reaction, and specificity – 100%.

Conclusions. The optimized method gives the possibility to detect simultaneously *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* DNA and determine the concentration of *Mycoplasma pneumoniae* DNA in sputum.

Keywords: polymerase chain reaction, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, DNA concentration, sputum

■ ВВЕДЕНИЕ

Mycoplasma pneumoniae (*M. pneumoniae*) и *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) причастны к развитию заболеваний верхних и нижних дыхательных путей наряду с такими пневмотропными возбудителями бактериальной природы, как *Streptococcus species*, *Staphylococcus species*, *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) [1–4]. Одновременная циркуляция представителей патогенной микробиоты респираторного тракта, высокая восприимчивость к ним, а также общий воздушно-капельный путь передачи создают благоприятные условия для возникновения смешанных инфекций [5, 6]. В ранее выполненных нами научных исследованиях получены данные, свидетельствующие о выявлении *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* при респираторной патологии как в форме моноинфекций, так и в ассоциациях, частота встречаемости которых достигает 20% от общего количества случаев инфицирования *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* [7]. В условиях смешанного инфицирования применение современного

специфичного и высокочувствительного метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) представляет собой перспективный способ диагностики инфекций, особенно обусловленных трудно культивируемыми патогенами, к которым относятся *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae*.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Усовершенствовать метод выявления ДНК *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* с использованием ПЦР-РВ на основе выбора оригинальных праймеров и проб для качественной, количественной и дифференциальной диагностики инфекций.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Усовершенствование метода на основе ПЦР-РВ включало в себя ряд этапов. На первом этапе проводили анализ нуклеотидных последовательностей референсных штаммов *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* и определяли фрагменты ДНК микроорганизмов, из которых затем выбирали участки для амплификации. Далее с учетом требований к структуре конструировали олигонуклеотидные праймеры и пробы для TaqMan ПЦР-РВ.

При усовершенствовании положенной в основу метода технологии полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) была применена ДНК *M. pneumoniae* (AmpliRun® *Mycoplasma pneumoniae* DNA Control, Vircell), 10^4 копий/мкл и ДНК *C. pneumoniae* (AmpliRun® *Chlamydia pneumoniae* DNA Control, Vircell), 10^4 копий/мкл для конструирования положительного контрольного образца (ПКО). ПКО общий включал плазмиды rMPp1 и rCPinc, в состав которых входили фрагмент Р1 гена *M. pneumoniae* и фрагмент Inc гена *C. pneumoniae* соответственно («Праймтех», Республика Беларусь): каждая плазида в концентрации 10^4 копий/мкл.

Амплификацию проводили согласно рекомендуемому протоколу к набору «Готовая смесь для ПЦР-РВ» («Праймтех», Республика Беларусь), варьировали температуру отжига и концентрацию праймеров.

Детекцию результатов ПЦР-РВ проводили на амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия).

Аналитическую чувствительности метода оценивали показателями предела обнаружения (копии на 1 мкл амплификационной смеси) ДНК матриц *M. pneumoniae* (ДНК *M. pneumoniae* и плазмиды rMPp1) и ДНК матриц *C. pneumoniae* (ДНК *C. pneumoniae* и плазмиды rCPinc).

Для оценки аналитической специфичности проводили амплификацию ДНК человека и пневмотропных бактерий: *Streptococcus pneumoniae* (*Str. pneumoniae*), *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*), *Streptococcus pyogenes* (*Str. pyogenes*) и *H. influenzae*.

Произведено сравнение чувствительности и специфичности усовершенствованного метода и метода, реализуемого с применением тест-системы «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydia pneumoniae*-FL» (ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Российская Федерация). Для выявления ДНК *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* использовали образцы ДНК, выделенные из соскобов эпителиальных клеток из полости носа, ротоглотки (214 образцов) и мокроты (70 образцов) детей с бронхитами и пневмониями.



Выделение ДНК из соскобов проводили с применением набора реагентов «Реал-Бест ДНК-экстракция 100» (АО «ВЕКТОР-БЕСТ», Российская Федерация). Суспензию клеточных элементов мокроты использовали для выделения ДНК с применением бромистого цетилтриметиламмония (ЦТАБ) [8].

Определяли концентрацию ДНК *M. pneumoniae* в мокроте (n=40) согласно ранее разработанному нами (2019 г.) авторскому методу [7].

Экономическую эффективность выявления ДНК *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* с применением усовершенствованного в ходе исследования метода оценивали по стоимости одного исследования, сравнивая с таковой, достигаемой применением коммерческого аналога.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для амплификации в мультиплексном формате праймеры для детекции ДНК *M. pneumoniae* и последовательность олигонуклеотидной меченой пробы выбраны на основе последовательности P1 гена *M. pneumoniae* (MPN141), продуктом которого является белок цитоадгезии, необходимый возбудителю для колонизации респираторного тракта. Известно, что P1 ген *M. pneumoniae* включает как повторяющиеся в геноме возбудителя участки, так и однокопийные. Для возможности проведения количественного выявления ДНК *M. pneumoniae* в мокроте дизайн праймеров и пробы проводили на основе однокопийного участка гена P1 *M. pneumoniae* [9] (табл. 1).

Праймеры для детекции ДНК *S. pneumoniae* и последовательность олигонуклеотидной меченой пробы выбраны на основе последовательности гена, кодирующего один из белков инклюзионной мембраны *S. pneumoniae* (Inc) [10] (табл. 2).

Таблица 1
Характеристика праймеров и пробы, подобранных для амплификации фрагмента генома *M. pneumoniae*

Table 1
Primers and probe for *M. pneumoniae* amplification

Штамм <i>M. pneumoniae</i> , примененный для дизайна праймеров и пробы	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129 (GenBank U00089.2)
Регион генома <i>M. pneumoniae</i> для дизайна праймеров и пробы	Однокопийный (184769...185741) в гене P1 (180858...185741)
Последовательности праймеров и пробы*	Прямой – ACACCAACGAACAGAGCTTAG Обратный – CAGTGGTAAGAAGTCACCGTTAT Проба CCCAACCAACAACAACGTTTCAGGT
Tm праймеров и пробы*	Прямой – 62 °C Обратный – 62 °C Проба – 68 °C
Длина ампликона	113 п. о.
Специфический фрагмент при амплификации ДНК штаммов <i>M. pneumoniae</i> (теоретический анализ**)	Образование специфического фрагмента в 113 п. о. возможно при амплификации ДНК 17 из 18 штаммов <i>M. pneumoniae</i> , представленных в международной базе данных Taxonomy (NCBI)
Продукты амплификации с ДНК человека и других пневмотропных бактерий (<i>Str. pneumoniae</i> , <i>Staph. aureus</i> , <i>Str. pyogenes</i> и <i>H. influenzae</i>)	Отсутствуют

Примечания: * для подбора праймеров и пробы, а также для проверки возможности образования олигонуклеотидами шпилек, гомо- и гетеродимеров применен онлайн-сервис OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>); ** теоретический анализ выполнен с применением онлайн-сервиса BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Таблица 2

Характеристика праймеров и пробы, подобранных для амплификации фрагмента генома *C. pneumoniae*

Table 2

Primers and probe for *C. pneumoniae* amplification

Штамм <i>C. pneumoniae</i> , примененный для дизайна праймеров и пробы	<i>Chlamydia pneumoniae</i> AR39 (GenBank AE002161.1)
Регион генома <i>C. pneumoniae</i> для дизайна праймеров и пробы	Ген Cr_0517 (558781...559638)
Последовательности праймеров и пробы*	Прямой – GAGGGTGGAACTATCCTGTTTC Обратный – GCGGATTGTCATTGGATCTCTA Проба ACCCACCAGAAGGAAGGTTCTCAA
Tm праймеров и пробы*	Прямой – 62 °C Обратный – 62 °C Проба – 68 °C
Длина ампликона	120 п. о.
Специфический фрагмент при амплификации ДНК штаммов <i>C. pneumoniae</i> (теоретический анализ**)	Образование специфического фрагмента в 120 п. о. возможно при амплификации ДНК 5 из 6 штаммов <i>C. pneumoniae</i> , представленных в международной базе данных Таксоному (NCBI)***
Продукты амплификации с ДНК человека и других пневмотропных бактерий (<i>Str. pneumoniae</i> , <i>Staph. aureus</i> , <i>Str. pyogenes</i> и <i>H. influenza</i>)	Отсутствуют

Примечания: * для подбора праймеров и пробы, а также для проверки возможности образования олигонуклеотидами шпилек, гомо- и гетеродимеров применен онлайн-сервис OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer/>); ** теоретический анализ выполнен с применением онлайн-сервиса BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); *** с гена Cr_0517 (558781...559638) *C. pneumoniae* AR39, гена CPn0245 (281645...282502) *C. pneumoniae* CWL029, гена CPj0245 (281267...282124) *C. pneumoniae* J138, гена CPK_RS02585 (560805...561662) *C. pneumoniae* LPCoLN, гена CrB0252 (279059...279916) *C. pneumoniae* TW-183, представляющих собой гены-ортологи.

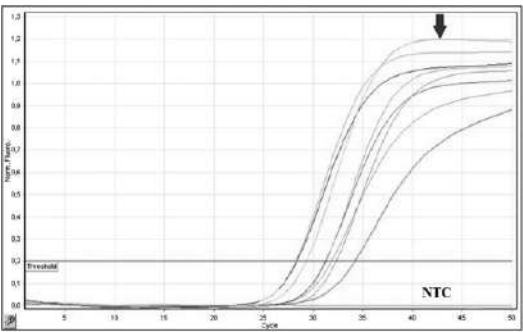
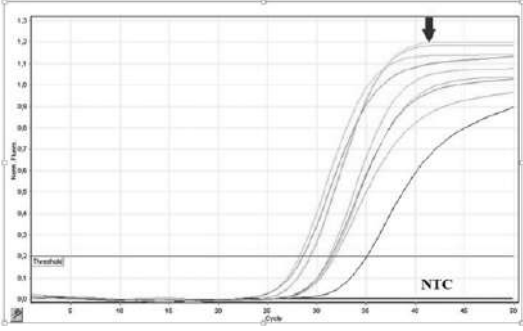
В ходе исследования установлен оптимальный вариант проведения амплификации с подобранными праймерами. Оптимизацию условий амплификации проводили на образцах ДНК *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* и ПКО, 10^4 копий/мкл (ДНК матрицы).

Протестировано несколько вариантов амплификации для анализируемых фрагментов P1 гена *M. pneumoniae* и Inc гена *C. pneumoniae*; при этом варьировали температуру отжига праймеров (от 54 °C до 56 °C) и их концентрацию от 100 до 300 мкмоль/л (табл. 3). Температурный режим, продолжительность других этапов амплификации, концентрация проб соответствовали значениям, рекомендуемым протоколом к набору «Готовая смесь для ПЦР-РВ» («Праймтех», Республика Беларусь).

Результаты показали, что оптимальными условиями амплификации для применения в мультиплексном формате является использование температуры отжига, равной 55 °C, и концентрации праймеров при амплификации ДНК *M. pneumoniae*: прямого – 150 мкмоль/л, обратного – 200 мкмоль/л. При амплификации ДНК *C. pneumoniae*: прямого – 150 мкмоль/л и обратного – 200 мкмоль/л. В данных условиях наблюдался наименьший Ct при максимальном уровне плато (табл. 3, стрелками указаны соответствующие кривые флуоресценции). Амплификация кратных разведений ДНК матриц позволила оценить эффективность мультиплексной реакции (E) и коэффициент детерминации (R^2), которые в выбранных условиях составили: E – 101% и 98%, R^2 – 0,99

Таблица 3
Оптимизация температуры отжига и концентрации праймеров в ПЦР смеси для детекции ДНК *M. pneumoniae* (А) и *S. pneumoniae* (В) методом мультиплексной ПЦР-РВ
Table 3

Optimization of annealing temperature and primer concentration in the PCR for detection of *M. pneumoniae* (A) and *S. pneumoniae* (B) DNA by multiplex RT-PCR

Кривые флюоресценции	T°C, F/R ^a , мкМ	Ct ^b	E, %	R ²
 <p>A</p>	54 °C, 100/100	31,30	88	0,78
	54 °C, 200/200	28,38	93	0,84
	54 °C, 300/300	28,28	94	0,91
	55 °C, 100/100	31,25	98	0,97
	55 °C, 150/200	29,30	101	0,99
	55 °C, 300/300	29,32	97	0,93
	56 °C, 100/100	34,20	90	0,90
	56 °C, 200/200	32,32	94	0,79
	56 °C, 300/300	31,86	95	0,88
 <p>B</p>	T°C, F/R, мкМ	Ct	E, %	R ²
	54 °C, 100/100	31,36	92	0,69
	54 °C, 200/200	28,63	94	0,82
	54 °C, 300/300	28,32	96	0,86
	55 °C, 100/100	31,48	96	0,98
	55 °C, 200/200	29,35	98	0,99
	55 °C, 300/300	29,41	97	0,93
	56 °C, 100/100	35,08	93	0,82
	56 °C, 200/200	31,86	90	0,79
56 °C, 300/300	31,65	94	0,85	

Примечания: ^a F – прямой праймер, R – обратный праймер, концентрация пробы в каждом случае 200 мкмоль/л; Ct^b – пороговый цикл амплификации, после которого начинается экспоненциальный рост количества продуктов ПЦР-РВ; E – эффективность амплификации; R² – коэффициент детерминации.

Таблица 4
Выявление контрольных ДНК при проведении ПЦР-РВ в различных форматах (моноплексном и мультиплексном)
Table 4

Detection of control DNA in real-time PCR in various formats (monoplex and multiplex)

ДНК матрица ^a	Формат анализа (пары праймеров)	Ct, медиана (мин...макс), n=10			
		10 ⁴ копий/мкл	10 ³ копий/мкл	10 ² копий/мкл	10 ¹ копий/мкл
MP	Мультиплексный	29,5 (29,2...29,8)	32,5 (32,0...32,7)	35,3 (34,8...35,9)	36,7 (36,3...37,1)
	Моноплексный	29,1 (29,0...29,6)	32,0 (31,8...32,4)	35,1 (34,6...35,8)	36,5 (35,8...36,9)
SP	Мультиплексный	29,8 (29,5...30,1)	31,8 (31,6...32,2)	34,9 (34,6...35,5)	36,6 (35,5...37,0)
	Моноплексный	29,4 (29,2...29,7)	31,6 (31,4...32,0)	34,7 (34,4...35,3)	36,0 (34,9...36,7)

Примечания: ^a ДНК матрица MP: ДНК *M. pneumoniae* или rMPp; ДНК матрица SP: ДНК *S. pneumoniae* или rSPinc.

при амплификации специфических фрагментов ДНК *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* соответственно (табл. 3).

Для оценки аналитической чувствительности мультиплексного ПЦР-РВ анализа с применением подобранных пар праймеров параллельно тестировались серийные разведения ДНК матриц *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* (табл. 4).

Далее ДНК матрицы *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* смешивали в различных концентрациях и тестировали в мультиплексной ПЦР-РВ для оценки способности усовершенствованного метода коамплифицировать ДНК матрицы *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae*, одновременно присутствующие в различных количествах в образцах (табл. 5).

При анализе результатов амплификации каждой из ДНК матриц отдельно при наличии обеих пар праймеров в реакционной смеси и различных концентраций ДНК матриц отсутствовали статистически значимые отличия в значениях C_t для моноплексной и мультиплексной ПЦР-РВ ($p < 0,05$) (табл. 4, 5). Добавление ДНК человека и пневмотропных бактерий (*Str. pneumoniae*, *Staph. aureus*, *Str. pyogenes* и *H. influenza*) не оказывало значимого влияния на значения C_t при амплификации ДНК матриц *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae*.

Значение показателей аналитической чувствительности усовершенствованного ПЦР-РВ метода составило 10 копий ДНК *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* на реакцию; при концентрации 1 копия на реакцию до 50% образцов были отрицательными. Результаты оценки аналитической чувствительности были сопоставимы с таковой, достигаемой с применением тест-системы «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae*/*Chlamydia pneumoniae*-FL» (Российская Федерация), которая в данном исследовании выбрана в качестве референсной.

Относительная чувствительность (количество истинно положительных результатов) и относительная специфичность (количество истинно отрицательных результатов) усовершенствованного метода в сравнении с референсным методом составили 100% (табл. 6, 7).

Для определения концентрации ДНК *M. pneumoniae* в мокроте параллельно проводили амплификацию ДНК, выделенной из мокроты, и калибраторов, представляющих собой 10-кратные разведения плазмиды rMPp1.

Рассчитанные по формуле [7] значения концентрации ДНК *M. pneumoniae* оценивали для случаев моноинфицирования *M. pneumoniae* – концентрация ДНК *M. pneumoniae* составила от 800 до 7600 копий/мл, и ассоциаций с бактериальной патогенной микробиотой респираторного тракта – концентрация ДНК *M. pneumoniae*

Таблица 5
Выявление контрольных ДНК при их коампликации в мультиплексной ПЦР-РВ
Table 5
Detection of control DNA during their co-amplification in multiplex RT-PCR

ДНК матрица ^a	C_t^a , медиана (мин...макс), n=10			
	MP		CP	
	10 ⁴ копий/мкл	10 ¹ копий/мкл	10 ⁴ копий/мкл	10 ¹ копий/мкл
MP и CP	29,6 (29,4...30,1)	–	–	36,8 (35,4...37,3)
MP и CP	–	36,5 (36,0...36,9)	30,0 (29,4...31,4)	–

Примечания: ^a ДНК матрица MP и CP: ДНК *M. pneumoniae* и ДНК *S. pneumoniae* или rMPp1 и rSPinc в концентрациях, представленных в таблице.



Таблица 6
Относительная чувствительность и специфичность усовершенствованного метода для выявления ДНК *M. pneumoniae*
Table 6
Relative sensitivity and specificity of optimized method for the detection of *M. pneumoniae* DNA

Клинический образец	Результаты применения усовершенствованного метода		Результаты применения референсной тест-системы	
			положительно	отрицательно
Мокрота	Всего исследовано 70 образцов	положительно	40	0
		отрицательно	0	30
Соскоб	Всего исследовано 214 образцов	отрицательно	25	0
		положительно	0	189

Таблица 7
Относительная чувствительность и специфичность усовершенствованного метода для выявления ДНК *C. pneumoniae*
Table 7
Relative sensitivity and specificity of optimized method for the detection of *C. pneumoniae* DNA

Клинический образец	Результаты применения усовершенствованного метода		Результаты применения референсной тест-системы	
			положительно	отрицательно
Мокрота	Всего исследовано 70 образцов	положительно	25	0
		отрицательно	0	45
Соскоб	Всего исследовано 214 образцов	отрицательно	15	0
		положительно	0	199

Таблица 8
Справочные данные для расчета экономической эффективности
Table 8
Data for calculating economic efficiency

Материалы	Цена, бел. руб.	Кол-во	Стоимость на 55 исследований, бел. руб.
Готовая смесь для ПЦР-РВ	120,0 на 200 реакций	55 реакций	33,0
Олигонуклеотиды немодифицированные в количестве 4 штуки (шт.)	40,0 за 2000 мкл	55 мкл × 4 шт.	4,4
Пробы для ПЦР в режиме реального времени в количестве 2 штуки (шт.)	200,0 за 2000 мкл	55 мкл × 2 шт.	11,0
Плазмидные стандарты в количестве 2 штуки (шт.)	150,0 за 2000 мкл	55 мкл × 2 шт.	8,3
Набор реагентов для выявления ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> и <i>Chlamydia pneumoniae</i> в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® <i>Mycoplasma pneumoniae/Chlamydia pneumoniae</i> -FL»	650,0 на 55 реакций	55 реакций	650,0

Примечание: цены на 01.02.2022.

составила от 24 000 до 61 000 копий/мл, что согласуется с ранее полученными результатами оценки концентрации ДНК *M. pneumoniae* в мокроте детей с бронхитами и пневмониями [7].

Экономическая эффективность выявления ДНК *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* с помощью ПЦР-РВ с применением оптимизированного метода основана на разнице стоимости коммерческого аналога («АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydia pneumoniae*-FL»), рассчитанного на 55 реакций, и предложенного метода. Справочные данные для расчета экономии затрат представлены в табл. 8.

Сумма затрат на выполнение 55 исследований по выявлению ДНК *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* с применением оптимизированного метода на основе мультиплексной ПЦР-РВ составляет 56,7 бел. руб. Затраты на приобретение готового коммерческого аналога составляют 650,0 бел. руб. На 01.02.2022 экономия затрат (ЭЗ) составила:

$$\text{ЭЗ} = 650,0 \text{ бел. руб.} - 56,7 \text{ бел. руб.} = 593,3 \text{ бел. руб.}$$

Если стоимость одного исследования при использовании коммерческой тест-системы составляет 11,8 бел. руб., то в случае применения усовершенствованного метода она снижается до 1,03 бел. руб. за исследование, то есть в 11,5 раза.

■ ВЫВОДЫ

1. Усовершенствован метод выявления ДНК *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* на основе ПЦР-РВ с мультиплексным форматом детекции, аналитическая чувствительность которого составила 10 копий ДНК *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* на реакцию.
2. Проведена апробация метода на биологическом материале (соскобах эпителиальных клеток из полости носа, ротоглотки; мокроте) детей с бронхитами и пневмониями, по итогам которой определены показатели относительной чувствительности и специфичности в сравнении с референсной тест-системой «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydia pneumoniae*-FL» (Российская Федерация), составившие 100%.
3. В ходе апробации метода установлена концентрация ДНК *M. pneumoniae* в мокроте детей с диагнозами «бронхит», «пневмония»: при моноинфицировании *M. pneumoniae* ее значения составили от 800 до 7600 копий/мл, в ассоциациях патогенных микроорганизмов концентрация ДНК *M. pneumoniae* принимала достоверно большие значения – от 24 000 до 61 000 копий/мл ($p < 0,05$, критерий Манна – Уитни).
4. При внедрении предложенного метода себестоимость одного исследования по выявлению ДНК *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* уменьшается в 11,5 раза в сравнении с таковой, достигаемой использованием тест-системы «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydia pneumoniae*-FL».



■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Musalimova G., Saperov V., Nikonorova T. Diagnostics and treatment of mycoplasma and chlamydia pneumonia. *Lechashchii vrats*. 2004;8:46–50. (in Russian)
2. Kovtun T., Tutel'yan A., Shabalina S. Modern conception of epidemiology and etiology of acute respiratory diseases in children. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2010;54(5):41–44. (in Russian)
3. Bradley J.S., Byington C.L., Shah S.S. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2011;53(7):25–76. doi: <https://doi.org/10.1093/cid/cir531>
4. Zhernosek V., Orynbasarova K., Batyrhanov Sh. *Acute pneumonia in children: treatment, prophylactics*. Minsk: BelMAPO; 2013. (in Russian)
5. Prozorovskii S., Rakovskaya I., Vul'fovich Yu. *Medical mycoplasmaology*. Moscow: Meditsina; 1995. (in Russian)
6. Alonso G.A., Rombauts A., Gudiol C. Influenza and bacterial coinfection in adults with community-acquired pneumonia admitted to conventional wards: risk factors, clinical features, and outcomes. *Open forum infectious diseases*. 2020;7(3): ofaa066. doi: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa066>
7. Glinkina T. Molecular genetic diagnostics and the structure of pathogenic microbiota under chlamydial and mycoplasma infections of respiratory tract in children. *Problemy zdorov'ya i ekologii*. 2019;62(4):11–17. (in Russian)
8. Kostyuk S., Rudenkova T., Glinkina T. Methodology of chlamydia and mycoplasma DNA detection in sputum. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa*. 2018;7(4):497–508. (in Russian)
9. Spuesens E.B., Oduber M., Hoogenboezem T. Sequence variations in RepMP2/3 and RepMP4 elements reveal intragenomic homologous DNA recombination events in *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology*. 2009;155(7):2182–2196. doi: 10.1099/mic.0.028506-0
10. Mueller K.E., Plano G.V., Fields K.A. New frontiers in type III secretion biology: the Chlamydia perspective. *Infection and Immunity*. 2014;82(1):2–9. doi: 10.1128/IAI.00917-13