

Государственная система санитарно-эпидемиологического
нормирования Российской Федерации

3.1. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ БАКТЕРИЯМИ РОДА MYCOPLASMA, У ДЕТЕЙ

Методические рекомендации
МР 3.1.0222-20

Москва 2020

Молекулярная диагностика инфекций, вызванных бактериями рода *Mycoplasma*, у детей. МР 3.1.0222-20

1. Разработаны ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора (Н.Ф. Бруснигина, В.Н. Мазепа, М.А. Махова, Е.В. Сперанская, О.М. Черневская, К.А. Орлова, Е.А. Колесникова, Л.Е. Скобло).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю. Поповой «24» ноября 2020 г.

3. Введены впервые.

I. Область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации (далее – МР) применяются при проведении исследований с целью выявления условно-патогенных и патогенных представителей бактерий рода *Mycoplasma*, вызывающих различные заболевания у детей (мочеполовой системы, центральной нервной системы, сердечно-сосудистой системы, органов дыхания, пищеварительной системы, опорно-двигательного аппарата), и осуществления мониторинга за распространением данных инфекционных агентов в человеческой популяции.

1.2. В МР представлен способ первичного (скринингового) выявления наиболее клинически значимых и распространенных бактерий рода *Mycoplasma* [20]. МР разработаны с целью унификации и совершенствования методов детекции бактерий рода *Mycoplasma* в связи с ростом заболеваемости, обусловленной этими микроорганизмами.

1.3. МР предназначены для органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы научными и медицинскими организациями, осуществляющие исследования бактерий рода *Mycoplasma*.

II. Общие положения

2.1. К настоящему времени доказана этиологическая роль бактерий рода *Mycoplasma* в развитии заболеваний органов дыхания (бронхит, пневмония, бронхиальная астма), центральной нервной системы (энцефалопатия, гидроцефалия, менингит, менингоэнцефалит), мочеполовой системы (уретриты, нефриты, циститы, вагиниты, аднекситы, кольпиты, цервициты, эндометриты), опорно-двигательного аппарата (артриты, артрозы), сердечно-сосудистой системы (перикардиты, кардиты), органов зрения (конъюнктивиты, кератиты), пищеварительного тракта [1-6]. Известно, что организм человека может быть колонизирован 16 видами микоплазм, из которых наибольший практический интерес вызывают следующие виды: *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium* [1].

2.2. По данным зарубежных и отечественных авторов инфицированность женщин репродуктивного возраста бактериями рода *Mycoplasma* составляет 25-55% [3, 4, 7]. Частота инфицирования детей внутриутробно и при родах *M. hominis* составляет 13–15%, *U. urealyticum* - 23-31% [8, 9].

2.3. В ряде случаев микоплазменные инфекции могут протекать бессимптомно. У детей, инфицированных внутриутробно или при родах, клинически инфекция может проявиться в период полового созревания. Течение микоплазменной инфекции у детей характеризуется чередованием стадий ремиссий и обострений.

2.4. Большое значение для профилактики и лечения инфекций, вызванных бактериями рода *Mycoplasma*, имеет целенаправленное обследование беременных

женщин на разных стадиях гестации, новорожденных и детей первого года жизни. Микоплазмы могут стать причиной невынашивания беременности, преждевременных родов, внутриутробного заражения плода и привести к развитию послеродового сепсиса [3]. В частности, после инфекционных аборт у 50-60% женщин выделяют *M. hominis*, а у 40-50% отмечают достоверное увеличение титров сывороточных антител. В настоящее время обсуждают связь инфекций, вызванных *M. hominis*, с мертворождениями и синдромом задержки внутриутробного развития, при этом выделение возбудителя у беременных увеличивается в 1,5-2 раза по сравнению с небеременными [3].

Способность *M. hominis* колонизировать эндометрий, плодное яйцо и индуцировать синтез простагландинов и других арахидонатов является одной из причин прерывания беременности на ранних сроках. Инфицирование микоплазмами на более поздних сроках беременности сопровождается формированием очага инфекции в околоплодных водах с последующим поражением базальной пластины и отторжением плода. В ряде случаев после накопления микоплазм в околоплодных водах возможно заражение плаценты и пупочного канатика, что приводит к инфицированию плода через систему кровоснабжения. Высокую частоту пороков развития (особенно центральной нервной системы) связывают со способностью микоплазм вызывать необратимые поражения хромосомного аппарата клеток, а также их проникновением через гематоэнцефалический барьер. В некоторых случаях возможно интранатальное заражение плода; в подобных ситуациях входными воротами становятся слизистые оболочки глаз, ротовой полости, половых органов и воздухоносных путей новорожденных [3, 5].

2.5. *M. pneumoniae* является этиологическим агентом до 40% и более случаев внебольничной пневмонии у детей, из них как минимум 18% случаев требуют госпитализации [10-12]. Несмотря на то, что *M. pneumoniae* не считается неонатальным патогеном, обнаружение с помощью полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР) ДНК *M. pneumoniae* в назофарингеальном аспирате младенцев с врожденной пневмонией свидетельствует о возможности трансплацентарной передачи возбудителя [13]. *M. pneumoniae*, попадая в бронхи, прикрепляется к клеткам эпителия и сливается своей мембраной с мембраной эпителиальной клетки. *M. pneumoniae* ингибирует активность аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) в клетках цилиарного эпителия, что приводит к нарушению подвижности ресничек мерцательного эпителия, их повреждению и гибели. Микоплазма может влиять на фагоцитоз, в результате чего он становится незавершенным, и нейтрофилы служат транспортным средством для диссеминации возбудителя.

Пневмония, обусловленная *M. pneumoniae*, имеет постепенное начало, продромальный период проявляется недомоганием, умеренной головной болью, сухим кашлем. Температура тела субфебрильная. На фоне невысокой лихорадки беспокоят миалгии, обычно в мышцах спины, бедер, проливные поты и сильная слабость. При осмотре определяются шейная лимфаденопатия, гепатоспленомегалия. Характерны тахикардия, тенденция к артериальной

гипотензии, мелкопузырчатые влажные хрипы, незвучная крепитация. У 25% больных возможны экзантемы в виде эритемы и синдрома Стивенса-Джонса. На 5-7 день заболевания у 50% больных возникает боль в грудной клетке на стороне поражения. К концу второй недели кашель становится продуктивным и сопровождается отделением вязкой слизистой мокроты. При легком течении микоплазменной инфекции имеет место катаральное воспаление верхних дыхательных путей в виде фарингита. Часто наблюдается сочетанное поражение верхних и нижних дыхательных путей: ринобронхит, ринофарингобронхит, фарингобронхит. Характерна большая выраженность и продолжительность кашля. Для детей характерно обилие мелкопузырчатых хрипов при аускультации в сочетании с конъюнктивитом. Температура тела часто остается нормальной, реже наблюдается постоянный или периодический субфебрилитет.

Инфекция, обусловленная *M. pneumoniae*, может играть роль в патогенезе астмы [14, 15].

Примерно у 6-7% пациентов с пневмониями, вызванными *M. pneumoniae*, могут возникать расстройства со стороны центральной нервной системы: энцефалиты, параличи черепно-мозговых нервов, мозжечковый синдром, асептический менингит или менингоэнцефалит, кома, когнитивные расстройства и др. [16-18].

Имеются сообщения о септических артритах с обнаружением *M. pneumoniae* непосредственно в синовиальной жидкости, особенно у пациентов с гипогаммаглобулинемией. Инфекция, обусловленная *M. pneumoniae*, может быть причиной перикардитов, миокардитов [6]. У детей *M. pneumoniae* вызывает конъюнктивиты, передние увеиты, оптические нейропатии и другие глазные заболевания [19].

2.6. Клиническая диагностика инфекций, обусловленных бактериями рода *Mycoplasma*, затруднена в связи с полиморфизмом клинических проявлений. Результаты лабораторных исследований играют решающую роль в постановке диагноза. Диагностику микоплазменной инфекции проводят с использованием микробиологических, серологических молекулярно-генетических методов (ПЦР, ПЦР-РВ, ПЦР «по конечной точке»). Серологические тесты требуют одновременного выявления специфических антител в парных сыворотках, отобранных в острой фазе заболевания и через 2-3 недели, поэтому диагноз может быть поставлен на основании четырехкратного увеличения титра антител только ретроспективно [2, 20]. ПЦР является прямым методом идентификации бактерий рода *Mycoplasma*, обладает высокими показателями специфичности и чувствительности.

III. Сущность метода

3.1. Сущность предлагаемого метода заключается в том, что с целью повышения эффективности выявления инфекционных агентов, снижения

инвазивности исследования для ПЦР-детекции клинически значимых и распространенных бактерий рода *Mycoplasma* исследованию подвергается ДНК, выделенная из смеси субстратов пациента (слюны, мочи, слезного отделяемого) различными вариантами метода ПЦР (классическая ПЦР, мультиплексная ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке») у детей разных возрастных групп.

Чувствительность метода составляет не менее $10^3 - 2 \times 10^3$ ГЭ/мл на миллилитр клинического образца.

IV. Работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности)

4.1. Работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней, а также с их материалами, инфицированными или потенциально инфицированными бактериями рода *Mycoplasma*, осуществляются в соответствии с санитарно-эпидемиологическим требованиями¹, а также могут использоваться методические указания².

4.2. Утилизация исходных субстратов и отходов ПЦР исследования осуществляется в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями³.

V. Средства измерений, реактивы, вспомогательное оборудование и материалы⁴

¹ СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2008 № 4 (зарегистрировано Минюстом России 21.02.2008, регистрационный номер 11197), с изменениями, внесенными постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 02.06.2009 № 42 (зарегистрировано Минюстом России 08.07.2009, регистрационный номер 14280), от 29.06.2011 № 86 (зарегистрировано Минюстом России 12.07.2011, регистрационный номер 21317) (далее - СП 1.3.2322-08); СП 3.1.2.3116-13 «Профилактика внебольничных пневмоний», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 18.11.2013 № 62 (зарегистрировано Минюстом России 05.02.2014, регистрационный номер 31225).

² МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний», утвержденные Роспотребнадзором 21.10.2013; МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности», утвержденные Роспотребнадзором 22.12.2009 (далее - МУ 1.3.2569-09).

³ СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 09.12.2010 № 163 (зарегистрировано Минюстом России 17.02.2011, регистрационный номер 19871).

⁴ **Примечание: допускается использование средств измерений, вспомогательного оборудования и материалов с аналогичными или лучшими характеристиками; допускается использование других реактивы с аналогичными характеристиками.**

5.1. Лаборатория, использующая методы амплификации нуклеиновых кислот, в соответствии с этапами проведения анализа включает рабочую зону 1 – для выделения (экстракции) нуклеиновых кислот, рабочую зону 2 – для проведения реакции амплификации и учета результатов амплификации при использовании гибридационно-флуоресцентного метода детекции, рабочую зону 3 – для детекции продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

5.1.1. Зона 1 – для выделения ДНК из исследуемого материала необходимо:

- бокс абактериальной воздушной среды биологической безопасности II или III класса биологической защиты;
- микроцентрифуга / вортекс;
- настольная центрифуга для микропробирок (по типу «Эппендорф» или аналоги) объемом 1,5 -2 мл до 10000g;
- твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25 - 100 °С;
- вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой;
- отдельный набор автоматических пипеток переменного объема;
- одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл или 2,0 мл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 и до 1000 мкл;
- штативы для наконечников, микропробирок на 1,5 мл;
- холодильник с камерами, поддерживающими температуру от плюс 2 до 8 °С и не выше минус 16 °С (для хранения наборов, предназначенных для выделения нуклеиновых кислот).
- холодильник с камерой, поддерживающей температуру от плюс 2 до 8 °С (для хранения препаратов нуклеиновых кислот). Не допускается хранение препаратов нуклеиновых кислот в одном холодильнике с компонентами набора для выделения нуклеиновых кислот;
- пробирки типа «Эппендорф» или аналоги;
- емкость с дезинфицирующим раствором;
- отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки⁵.
- одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

5.1.2. Зона 2 – для проведения ПЦР-амплификации⁶ необходимо:

- бокс абактериальной воздушной среды биологической безопасности II и III класса или настольный бокс с бактерицидной лампой (ПЦР-бокс; УФ-бокс);
- программируемые термоциклеры;

⁵ МУ 1.3.2569-09.

⁶ Примечание: с целью автоматизации процедуры приготовления реакционных смесей для амплификации допускается использование автоматизированного оборудования для раскапывания реагентов.

- флюориметр типа «АЛА1/4» или его аналоги (при использовании тест-систем, основанных на принципе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «по конечной точке»);

- микроцентрифуга / вортекс;
- отдельный набор автоматических пипеток переменного объема;
- одноразовые полипропиленовые пробирки для амплификации объемом 0,5 (0,2) мл;
- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 10 мкл, 100 мкл и 200 мкл, свободные от ДНКаз;
- штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 (0,2) мл;
- холодильник с камерой, поддерживающей температуру от плюс 2 до 8 °С, и с морозильной камерой не выше минус 18°С;
- емкость для сброса отработанных расходных материалов;
- отдельный халат и одноразовые перчатки⁷;

5.1.3. Зона 3 – для детекции продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле необходимо:

- камера для горизонтального электрофореза;
- источник постоянного тока с напряжением 150-400 В;
- ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей;
- видеосистема с цифровой камерой для регистрации результатов (система гель-документирования);
- вортекс;
- микроволновая печь для плавления агарозы;
- холодильник с камерой, поддерживающей температуру от плюс 2 до 8 °С;
- весы электронные от 0,1 мг до 1,0 кг;
- колба коническая из термостойкого стекла для плавления агарозы на 250 мл;
- мерный цилиндр на 1 л;
- штатив для микропробирок на 0,5(0,2) мл;
- отдельный набор автоматических пипеток переменного объема;
- одноразовые наконечники до 200 мкл в штативе;
- емкость для сброса наконечников;
- пластиковая емкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия;
- одноразовые халат, шапочка, сменная обувь, одноразовые перчатки⁸.

5.2. Наборы реагентов для обработки клинического материала: комплекты реагентов и тест-систем, зарегистрированные и разрешенные для использования на территории Российской Федерации в установленном порядке для выделения ДНК из мочи, слюны, слезного отделяемого, основанные на лизисе клеток детергентами и сорбции нуклеиновых кислот.

5.3. Наборы реагентов для постановки ПЦР: ПЦР-тест системы, зарегистрированные и разрешенные для использования на территории Российской

⁷ МУ 1.3.2569-09.

⁸ МУ 1.3.2569-09.

Федерации, для выявления *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium*, имеющих внутренний контроль ингибирования ПЦР и систему антиконтаминационной модификации ампликонов, которые уменьшают вероятность получения ложноотрицательных и ложноположительных результатов.

Рекомендуется использовать тест системы, основанные на принципе ПЦР в режиме реального времени (ПЦР РВ), позволяющие в мультиплексном формате одновременно обнаруживать *M. hominis*, *M. genitalium*, *Ureaplasma ssp.*

5.4. Набор реагентов для проведения электрофореза в агарозе: комплекты реагентов для качественной электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле, содержащие агарозу для электрофореза, компоненты буфера для электрофореза, интеркалирующий агент-краситель.

5.5. Для обеспечения санитарно-эпидемического режима в лаборатории при работе с возбудителями III - IV групп патогенности и для предотвращения контаминации продуктами амплификации используются стандартные дезинфицирующие растворы в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁹ и методическими указаниями¹⁰.

VI. Подготовка материала для исследований

Общие сведения при проведении исследования

6.1. При проведении анализа используются кровь, моча, слюна, слезное отделяемое. Для увеличения эффективности выделения инфекционных агентов рекомендуется исследовать смесь субстратов мочи, слюны, слезного отделяемого [20]. Отбор материала на исследование проводится до начала антибиотикотерапии.

6.2. Отбор, транспортировка и хранение клинического материала проводится в соответствии с методическими указаниями¹¹.

6.3. Отбор материала осуществляет специалист медицинской организации.

6.4. Образцы мочи отбираются до подмывания ребенка. Собирается первая порция утренней мочи в количестве не более 2 мл.

6.5. Образцы слюны собираются утром до чистки зубов, натошак.

6.6. Слезное отделяемое или смыв с конъюнктивы собираются до умывания. С целью получения смыва с конъюнктивы несколько капель стерильной воды наносится на поверхность глаза, затем жидкость из уголка глаза собирается стерильной одноразовой пипеткой и переносится в пробирку по типу «Эппендорф».

6.7. Кровь исследуется при наличии у ребенка лихорадки и клинически выраженной полилимфоаденопатии. Образцы крови отбирают в вакуумные системы, не содержащие антикоагулянтов и других реактивов, не менее 2 мл.

6.8. Отобранный клинический материал доставляется в тот же день в течение 3-4 часов в лабораторию. При длительной транспортировке пробирки и

⁹ СП 1.3.2322-08.

¹⁰ МУ 1.3.2569-09.

¹¹ МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденные Роспотребнадзором 23.12.2005.

емкости в полиэтиленовых пакетах помещаются в термос со льдом и в таком виде транспортируются.

6.9. Пробы следует хранить в холодильнике при температуре плюс $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 16 часов и/или в морозильной камере при температуре минус $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 2 недель. Необходимо сохранять отдельные субстраты от каждого пациента до завершения исследования.

6.10. Пробирки с пробами субстратов от одного пациента не должны соприкасаться с пробирками с материалом от других пациентов.

Получение венозной крови для ПЦР исследования

6.11. Взятие крови производится натошак или через 3 часа после приема пищи одноразовым шприцем из локтевой вены в положении сидя. Взятие крови осуществляют в одноразовые 1,5 мл пробирки по типу «Эппендорф» в объеме не более 1 мл. Непосредственно перед взятием крови производится дезинфекция кожи в месте венепункции циркулярными движениями от центра к периферии дважды 70% раствором спирта.

Получение свободно отделяемой мокроты для ПЦР-детекции *M. pneumoniae*

6.12. Для сбора мокроты используют стерильные герметично закрывающиеся пластиковые контейнеры. Перед сбором мокроты пациента просят тщательно прополоскать рот кипяченой водой. Сбор мокроты осуществляется натошак или не ранее двух часов после еды. Пациент должен сделать несколько глубоких вдохов с задержкой дыхания на несколько секунд, затем с силой выдохнуть, что способствует появлению продуктивного кашля и очищению верхних дыхательных путей от мокроты. Затем пациента просят хорошо откашляться и собрать отделяемое из нижних дыхательных путей в одноразовый контейнер с широким горлом и завинчивающейся крышкой объемом 50 мл. Объем образца мокроты должен составлять не менее 1 мл.

Получение мазков из ротоглотки для ПЦР-детекции *M. pneumoniae*

6.13. Мазок берут после полоскания полости рта кипяченой водой комнатной температуры. Перед процедурой в течение 6 часов не разрешается использовать медикаменты, орошающие ротоглотку и препараты для рассасывания во рту. Мазки берут сухим одноразовым стерильным зондом из полистирола с вязким тампоном вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки, аккуратно прижимая язык пациента шпателем. После отбора материала рабочую часть зонда с тампоном помещают в стерильную одноразовую пробирку по типу «Эппендорф» объемом 1,5 мл с защелкивающейся крышкой, содержащую 500 мкл стерильного 0,9%

раствора хлорида натрия. Конец зонда с тампоном (1 см) отламывают, таким образом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку.

Получение слюны у детей первого года жизни для ПЦР-детекции *M. hominis*

6.14. Отбор слюны у детей первого года жизни проводят утром до кормления с помощью простерилизованной путем обжига (фламбированием) чайной ложки. Отобранную слюну из ложки переносят в сухие одноразовые 1,5 мл пробирки по типу «Эппендорф» с помощью одноразового шприца без иглы.

Все пробирки и флаконы с биологическими субстратами, отобранными от одного больного, маркируются и помещаются в отдельный одноразовый полиэтиленовый пакет. Пакеты помещают в специальный термоконтейнер с охлаждающими элементами таким образом, чтобы сохранить вертикальное положение и доставляют в лабораторию в течение 2–4 часов.

VII. Порядок проведения исследований

Выделение ДНК из клинического материала

7.1. Проводится в зоне 1 – помещении для обработки клинического материала.

7.2. На первом этапе ДНК выделяют из смеси биологических субстратов от каждого пациента. Исследованию подвергают смесь мочи, слюны, слезного отделяемого.

7.3. Субстраты от одного пациента смешивают в 1,5 мл одноразовой пробирке в равных количествах таким образом, чтобы объем смеси составил 100 мкл, что является рекомендуемым объемом материала при выделении ДНК с использованием реагентов и тест-систем, зарегистрированных на территории Российской Федерации.

7.4. В соответствии с количеством обследуемых пациентов готовят необходимое количество одноразовых пробирок (включая отрицательный контроль выделения). Пробирки маркируют.

7.5. Выделение нуклеиновых кислот из смеси клинических материалов проводят в соответствии с инструкцией по применению выбранного набора реагентов для обработки клинического материала.

7.6. Очищенную ДНК можно хранить в течение недели при температуре от плюс 2 до 8 °С и в течение 1 года при температуре минус 20±2°С. Препараты ДНК, выделенные из смеси субстратов, сохраняют до завершения исследования.

7.7. Образцы крови исследуются отдельно от других субстратов по показаниям, а именно, при наличии у ребенка лихорадки и клинически выраженной полилимфоаденопатии. Выделение ДНК из образцов крови проводят

с использованием реагентов и тест-систем, зарегистрированных на территории Российской Федерации.

Амплификация ДНК (постановка ПЦР)

7.8. Проводится в зоне 2 – помещении для раскапывания реагентов и проведения ПЦР.

7.9. ПЦР-детекция *M. hominis*, *M. pneumoniae*, *M. genitalium* проводится с использованием зарегистрированных в Российской Федерации классических тест-систем, и мультиплексных систем в соответствии с инструкцией по их применению.

7.10. При детекции *M. genitalium* рекомендуется использование метода минипулов. Препараты ДНК, выделенные из субстратов от трех (четырёх, пяти) человек смешивают в равных объемах таким образом, чтобы получился объем, который указан в наставлении к ПЦР тест системам, как объем исследуемого образца, вносимый в реакционную смесь. Например, если объем исследуемого образца 10 мкл, то от 5 человек берут по 2 мкл раствора ДНК; от 4 – по 2,5 мкл; от 3 – 3,3 мкл.

7.11. При использовании тест-систем, основанных на принципе ПЦР-РВ, результат регистрируется непосредственно в процессе амплификации.

7.12. При использовании тест-систем, основанных на принципе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «по конечной точке», после завершения амплификации проводят измерение сигнала флуоресценции в образцах на флуориметрах по типу «АЛА-1/4» или его аналогах.

7.13. При использовании классических ПЦР тест-систем, зарегистрированных на территории Российской Федерации, выявление продукта амплификации производится методом электрофореза в агарозном геле.

Выявление продукта амплификации классической ПЦР

7.14. Проводится в зоне 3 – помещении для детекции продуктов амплификации. Продукт ПЦР – это фрагмент ДНК, имеющий определенный размер, одним из наиболее доступных способов его обнаружения является электрофоретическое разделение реакционной смеси в агарозном геле.

7.15. Для проведения электрофореза используют комплекты реагентов для качественной электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле. Электрофорез проводят в соответствии с инструкцией по применению соответствующего набора реактивов.

7.16. Для снижения риска контаминации тестируемых образцов продуктами амплификации предыдущих ПЦР-исследований непосредственно перед проведением электрофореза в каждую ПЦР-пробу под воск вносят по 5 мкл препарата урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) отдельным наконечником и перемешивают пипетированием. Инкубируют при комнатной температуре

(не ниже 20⁰ С) в течение 10 минут, после чего вносят по 5 мкл пробы в лунки 1,5% агарозного геля и проводят электрофорез.

7.17. Регистрацию результатов электрофореза проводят с помощью ультрафиолетового трансиллюминатора. В УФ-свете видны оранжевые полосы, соответствующие фрагментам ДНК.

7.18. Изображение геля фиксируют в памяти персонального компьютера с помощью цифровых систем для обработки видеoinформации.

Интерпретация результатов электрофореза

7.19. Положительными считаются образцы, содержащие полосу (фрагмент ДНК), расположенную на одном уровне с полосой (фрагментом ДНК) положительного контроля. В положительных и отрицательных образцах должна присутствовать полоса (фрагмент ДНК) внутреннего контрольного образца (далее – ВКО), расположенного на геле выше специфического фрагмента. В положительных пробах в случае синтеза большого количества копий специфического фрагмента, полоса ВКО может отсутствовать.

7.20. Отрицательный контроль и отрицательные пробы должны содержать полосу ВКО и не содержать других полос. Отсутствие полосы ВКО и полосы специфического фрагмента свидетельствует об ингибировании ПЦР в данном образце. Проба должна быть переобработана. В случае повторения ингибирования исследованию подлежит вновь собранный материал.

7.21. При использовании тест систем, не имеющих ВКО, в положительных образцах содержится только одна полоса искомого фрагмента ДНК. В дорожках, соответствующих отрицательному контролю этапа ПЦР (К-) и отрицательному контролю этапа выделения (ОК) не должно быть никаких полос, за исключением праймер-димеров, находящихся ниже уровня 100 нуклеотидных пар.

VIII. Эффективность использования метода

8.1. Проведенное исследование позволяет установить распространенность бактерий рода *Mycoplasma* у детей разных возрастных групп при различных нозологических формах заболеваний [21]. Практически при всех нозологических формах частота выявления *M. hominis* высокая и варьирует от 5 до 38%, что согласуется с опубликованными данными о частоте обнаружения микоплазм у детей.

Чаще всего *M. hominis* выявляются у недоношенных новорожденных и детей первых месяцев жизни с поражением центральной нервной системы и аллергиями. *M. pneumoniae* выявляется, как правило, при воспалительных заболеваниях органов дыхания [21-24]. *M. genitalium* обнаруживается у детей в единичных случаях при внутриутробных инфекциях (далее – ВУИ) [25, 26].

8.2. Частота выявления бактерий рода *Mycoplasma* у детей с различными формами патологии и у детей разных возрастных групп представлены в таблицах 1 и 2 приложения 1 к настоящим МР.

8.3. Использование предлагаемой методологии позволяет установить этапы колонизации макроорганизма бактериями рода *Mycoplasma*. Частота выявления *M. hominis* у детей первого года жизни составляет 10 – 16%, а у детей в возрасте от 2 до 13 лет – 6-13 %. Второй этап колонизации макроорганизма микоплазмами начинается с 14-ти лет и связан с половым путем передачи. Частота выявления *M. hominis* у здоровых детей в возрастной период от 14 до 16 лет достигает 27%.

8.4. Случаи выявления *M. pneumoniae* зарегистрированы у детей в возрасте 10 месяцев и старше редкие, что свидетельствует о нецелесообразности обследования новорожденных и детей первых месяцев жизни на данный возбудитель в случае отсутствия клинических признаков воспалительных заболеваний органов дыхания.

8.5. Исследование смеси нескольких клинических субстратов на весь спектр инфекционных агентов уменьшает вероятность ложноотрицательных результатов на 25-30% по сравнению с анализом только одного субстрата. Анализ смеси субстратов экономичнее в 2-3 раза и занимает в 1,5-2 раза меньше времени, чем развернутый анализ отдельных субстратов.

С целью проверки чувствительности и эффективности метода минипулов могут быть проведены сравнительные исследования 50-ти образцов с известным содержанием инфекционных агентов. Используется метод ПЦР-минипулов и индивидуальное ПЦР-исследование всех образцов. Пулы состояются таким образом, чтобы в каждом присутствовал только один образец, содержащий инфекционный агент (для получения максимального разведения). Результаты, полученные методом минипулов и индивидуальным анализом образцов, совпадает до 100% случаев. Разведение при пулировании 5 образцов не оказывает значительного влияния на эффективность выявления инфекционного агента. Чувствительность составляет не менее 10^3 – 2×10^3 ГЭ/мл на миллилитр клинического образца.

8.6. Использование метода для этиологической диагностики широкого спектра нозологических форм у детей позволяет осуществлять мониторинг распространенности бактерий рода *Mycoplasma*, своевременно проводить эффективную антибактериальную терапию и снизить риск возникновения осложнений.

8.7. Алгоритм ПЦР-детекции *M. hominis*, *M. genitalium* у детей при подозрении на ВУИ представлен на рисунке 1 приложения 2 к настоящим МР.

Алгоритм ПЦР-детекции *M. pneumoniae* у детей представлен на рисунке 2 приложения 2 к настоящим МР.

Частота выявления бактерий рода *Mycoplasma* у детей

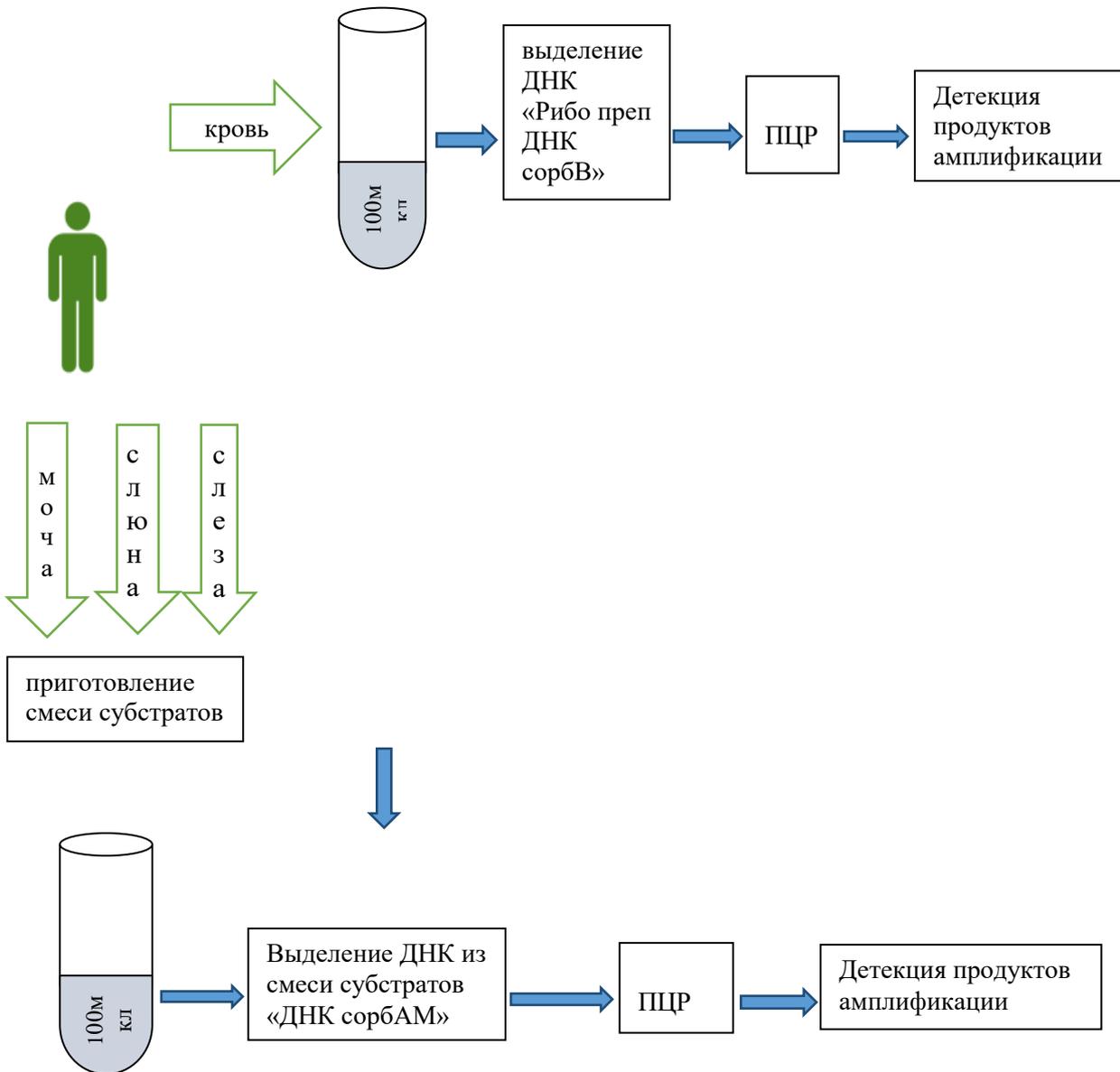
Таблица 1

Частота выявления бактерий рода *Mycoplasma* у детей
с различными формами патологии

Нозологические формы	Частота выявления микроорганизмов (в %)		
	<i>M. hominis</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>M. pneumoniae</i>
Гипотрофия	10,8	0	0
Аллергоз	22,2	0	0
Артрит	11,7	0	0
Гепатоспленомегалия	11,5	0	0
Дерматит	10,3	0	0
Желтуха	6,3	0	0
Кардит	11,5	0	0
Конъюнктивит	11,1	0	0
Полилимфаденопатия	8,1	0	0,9
Недоношенность	23,4	0	0
Субфебрилитет	6,8	0	1,0
Анемия	13,3	0	0
Гидроцефалия	16,0	0	0
Энцефалопатия	38,0	0	0
Поражение ЦНС	16,8	0	0,8
ВУИ	14,0	0,9	2,6
Энтерит	10,5	0	0
Часто болеющий ребенок	4,9	0	0
ОРЗ-ОРВИ	8,5	0	4,0
Бронхит	10,9	0	7,8
Пневмония	10,5	0	21,7
Астма	10,5	0	6,1

Частота выявления бактерий рода *Mycoplasma* у детей
разных возрастных групп

Возраст	Частота выявления (в %)		
	<i>M. hominis</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>M. pneumoniae</i>
Новорожденные	11,5	0	0
1 месяц	12,1	0	0
2 месяц	12,8	0	0
3 месяц	16,7	0	0
4 месяц	11,5	0	0
5 месяц	10,3	0	0
6 месяц	13,8	0	0
7 месяц	12,7	0	0
8 месяц	9,6	0	0
9 месяц	9,5	0	0
10 месяц	9,8	0	0,9
11 месяц	13,9	0	1,2
12 месяц	13,2	0	0
2 год	12,9	0	2,9
3 год	7,4	0	6,0
4 год	7,7	0	7,1
5 год	8,3	0	5,3
6 год	10,1	0	5,5
7 год.	11,7	0	7,5
8 год	7,5	0	8,8
9 год	6,3	0	19,4
10 год	11,4	0	14,3
11 год	7,8	0	5,6
12 год	12,2	0	7,7
13 год	12,9	0	26,3
14 год	19,6	0	25,0
15 год	22,8	0	9,5
16 год	27,7	0	30,7

Алгоритмы ПЦР-детекции *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. pneumoniae* у детейРис.1. Алгоритм ПЦР-детекции *M. hominis*, *M. genitalium* у детей при подозрении на ВУИ.

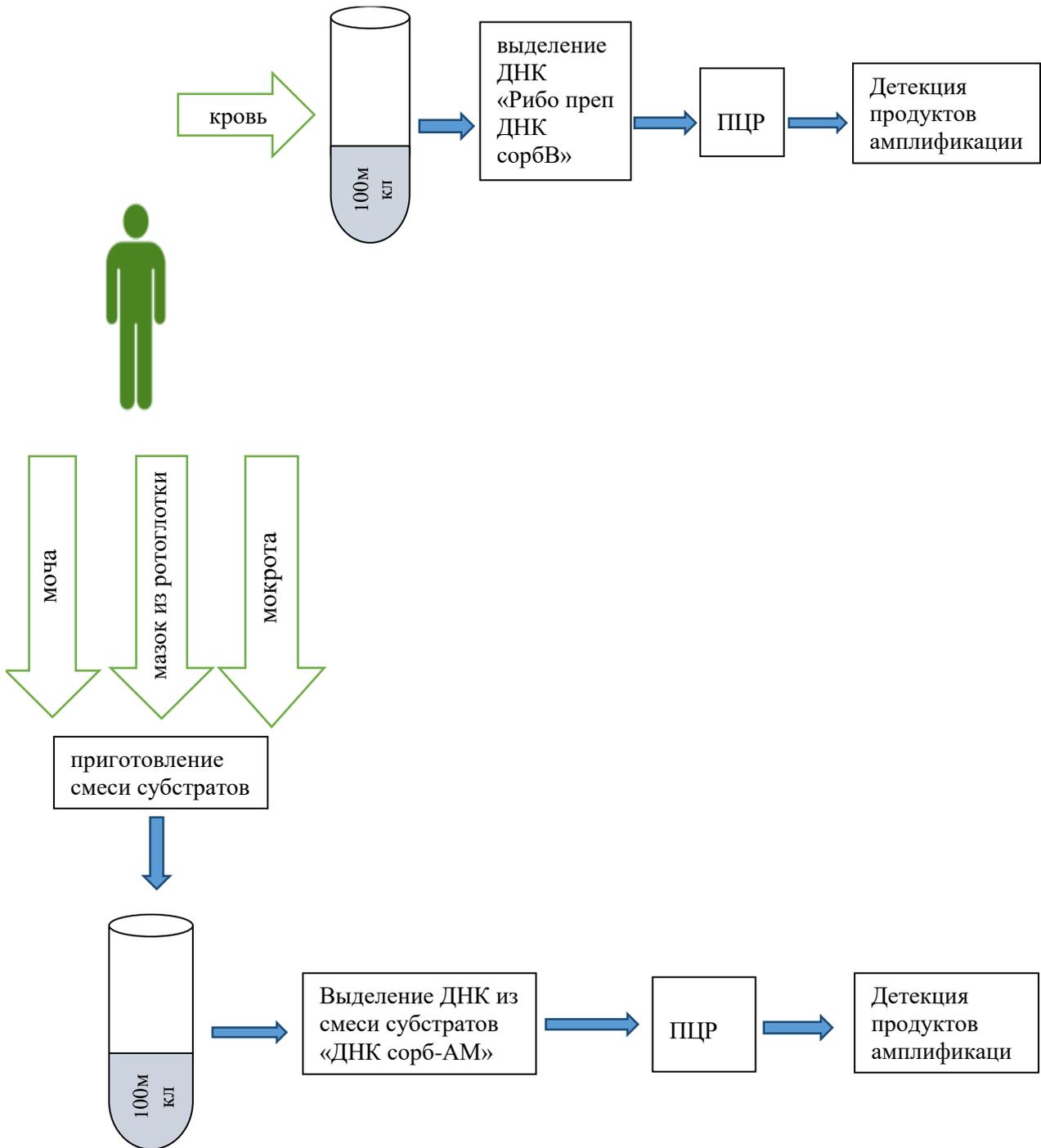


Рис. 2. Алгоритм ПЦР-детекции *M. pneumoniae* у детей.

Нормативные и методические документы

1. Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
2. Постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий».
3. СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
4. СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
5. СП 3.1.2.3116-13 «Профилактика внебольничных пневмоний».
6. СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».
7. Приказ Минздрава России от 06.06.2012 № 4н «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий».
8. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».
9. МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».
10. МУ 3.1.2.3047-13 «Эпидемиологический надзор за внебольничными пневмониями».
11. МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний»

Библиографические ссылки

1. Борхсениус С.Н. Микоплазмы в биологии и медицине начала XXI века /С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова, В.М. Чернов, И.Е. Вишняков. - СПб.: Наука, 2016. – 333 с.
2. Раковская В.И. Микоплазмы и микоплазменные инфекции / И.В. Раковская // Вестник дерматологии и венерологии. – 2008. - № 5. – С. 60 – 65.
3. Белова А.В. Генитальные микоплазмы (*U. parvum*, *U. urealyticum*, *M. hominis*, *M. genitalium*) в структуре инфекционных осложнений в акушерстве, гинекологии и перинатологии / А.В. Белова, А.П. Никонов // Альманах клинической медицины. – 2015. - № 39. – С. 140 – 150.
4. Инфекционные болезни: Учебник для мед.вузов/Под ред. Чл.- кор.РАМН, проф. Ю.В. Лобзина- СПб: СпецЛит. – 2001. – 543с.
5. Белова А. В. Генитальные микоплазмы (*Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*) в развитии осложнений беременности, родов и послеродового периода / А. В. Белова, О. Р. Асцатурова, Л. С. Александров, А. П. Никонов, Т. А. Иванова, А. Е. Гуцин //Архив акушерства и гинекологии им. В. Ф. Снегирева. – 2014. - № 1(2). – С. 26 – 31.
6. Трякина И.П. Микоплазменная инфекция, микоплазменные поражения легких, сердца, суставов // Терапевт. 2015. №9. С32 – 43.
7. Савичева А.М. Роль микоплазм в урогенитальной патологии женщин и их половых партнеров /А.М. Савичева, В.Н. Прилепская, Е.В. Соколовский, В.И. Кисина, А.Е. Гуцин, К.И. Забиров//Ж. акушерства и женских болезней. – 2008. – Т.LVII вып.1. –С.11 – 17.
8. Мазепа В.Н. Выявление возбудителей негонококковых урогенитальных инфекций у новорожденных и детей разного возраста с подозрением на внутриутробное инфицирование /В.Н. Мазепа, О.М. Черневская, Н.Ф. Бруснигина [и др.] // «Генодиагностика инфекционных заболеваний». - Материалы IV Всероссийской НПК.- М. - 2002. - С.50 – 52.
9. Карапетян Т.Э. Исходы беременности и генитальные микоплазмы / Т.Э. Карапетян // Гинекология. – 2017. – Т. 19, № 3. – С. 73 – 76.
10. Киличева Т.А. Микоплазменные пневмонии / Т.А. Киличева, Н.П. Бокматова, М.М. Алимова// Актуальные научные исследования в современном мире. 2017.№12(32). С.26 – 32.
11. Сперанская Е.В. Роль бактерий родов *Mycoplasma* и *Ureaplasma* в развитии воспалительных заболеваний органов дыхания у детей / Е.В. Сперанская, В.Н. Мазепа, Н.Ф. Бруснигина и др. //Медицинский альманах.- 2011.-№4(17).-С.49 – 50.
12. Vervloet L.A. Infection by *Mycoplasma pneumoniae* and its importance as an etiological agent in childhood community-acquired pneumonias/ L.A. Vervloet, C. Marguet, P.A. Camargos // Braz. J. Infect. Dis. -2007.-Vol. 11.-№5.-P.507 – 14.
13. Waites K.B. Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* / K.B. Waites, R.L. Schelonka, L. Xiao [et al.] // Semin Fetal Neonatal Med. – 2009. – Vol.14, № 3. – P.190 – 199.

14. Thumerelle C. Role of viruses and atypical bacteria in exacerbations of asthma in hospitalized children: a prospective study in the Nord-Pas de Calais region (France)/ C. Thumerelle, A. Deschildre, C. Bouquillon et al.// *Pediatr. Pulmonol.* - 2003. – Vol. 35.-P. 75 – 82.

15. Korppi M. Bacterial infections and pediatric asthma/M. Korppi// *Immunol. Allergy Clin. North. Am.*-2010.- Vol.30.-№4.-P.565 – 574.

16. Bitnun A. Acute childhood encephalitis and *Mycoplasma pneumoniae*/ A. Bitnun, E. L. Ford-Jones, M. Petric et al.// *Clin. Infect. Dis.* - 2001. Vol.32.- P.1674 – 1684.

17. Behan P. O. Neurological aspects of mycoplasmal infection/ P. O. Behan, R. G. Feldman, J. M. Segerra et al.//*Acta Neurol. Scand.*-1986.-Vol.74.-P.314 – 322.

18. Lin W. C. *Mycoplasma pneumoniae* encephalitis in childhood/ W.C. Lin, P.I. Lee, C.Y. Lu et al.//*J. Microbiol. Immunol. Infect.*-2002.-Vol.35.-P.173 – 178.

19. Чернакова Г.М. Микст-инфекции и воспалительная офтальмопатология: клинико-лабораторные наблюдения/Г.М. Чернакова, Д.Ю. Майчук, Е.А. Клещева, Ю.Б. Слонимский, Т.Б. Семенова// *Вестник офтальмологии.*-2017. -№4.-С.74 – 81.

20. Патент на изобретение № 2271003 Российская Федерация, НПК G01N33/48; C12Q1/68, Заявка №2003132188 от 03.11.2003 г., публикация патента 27.02.2006 г., бюлл № 6 Способ выявления наиболее значимых возбудителей негонококковых урогенитальных инфекций (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex I/II*) у детей с использованием метода ПЦР.

21. Мазепа В.Н. Оптимизация и комплексное использование полимеразной цепной реакции в диагностике актуальных инфекционных заболеваний на модели острых кишечных, хеликобактерной, негонококковых урогенитальных инфекций и вирусных гепатитов //Автореф. дисс. докт. -М.-2010. – 48с.

22. Кокорева С.П. Микоплазменная пневмония и факторы риска её развития при вспышке респираторного микоплазмоза в детском коллективе / С.П. Кокорева, О.А. Разуваева// *Вопросы практической педиатрии.* -2016.- Т.11.- №2. -С.65 – 70.

23. Царькова С.А. Характеристика микоплазменной пневмонии у детей и анализ качества антимикробной терапии / С.А. Царькова, Д.Е. Костенко, О.А. Онищенко // *Вестник Уральского государственного медицинского университета.* 2019.№ 3. С.108 – 113.

24. Донцова Я.Ф. Микоплазменная пневмония у детей./ Я.Ф. Донцова, Е.В. Ковшар, Д.В. Вежновец // *Студенческий вестник.* 2020.№12-21. С.60 – 62.

25. Мальцева Л.И. Микоплазменная инфекция в акушерской и перинатальной патологии / Л.И. Мальцева, Т.П. Зефирова, Л.А. Лобова, Э.Р. Идиятуллина, А.Р. Фаттахова, И.М. Шишочкина // *Казанский медицинский журнал.* – 2008. – Т. 86, № 2. – С.131 – 135.

26. Савичева А.М. Инфекции матери, плода и новорожденного / А.М. Савичева // *Педиатр.* – 2014. – Т. 5, № 3. – С.1 – 8.