

Я. А. Дзюблик
**МЕСТО НЕКУЛЬТУРАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИЙ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ**

ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф. Г. Яновского НАМН Украины»

Проблема внебольничных инфекций нижних дыхательных путей не утрачивает своей актуальности, несмотря на все успехи современной антимикробной химиотерапии. Это, прежде всего, обусловлено высокими показателями заболеваемости и величиной материального бремени для общества вследствие больших расходов на оказание медицинской помощи и покрытие временной нетрудоспособности больных. Для оптимизации лечебного процесса критическое значение имеет знание этиологии инфекционного процесса у данных больных. В настоящее время назначение антимикробных препаратов чаще всего производится эмпирически с учетом доступной информации о преобладании тех или иных микроорганизмов и их чувствительности, что, в свою очередь, зависит от географического расположения, условий возникновения заболевания, состояния макроорганизма и прочих факторов [7].

Для установления этиологии инфекций нижних дыхательных путей в лабораторной диагностике используются несколько подходов — микробиологический, иммунологический и генотипический. Общепринятым и наиболее широко используемым является микробиологический подход, обеспечивающий возможность изучения целого ряда клинически важных фенотипических свойств микроорганизмов. В тех случаях, когда подход эффективен, наблюдается наилучшее соответствие принципам причинной обусловленности ассоциации. К недостаткам микробиологического подхода следует отнести так называемую «некультивируемость» микроорганизмов. Последняя связана со многими факторами, в том числе с отсутствием адекватных питательных сред или невозможностью подобрать оптимальные условия культивирования для определенных микроорганизмов, неправильным забором клинического материала, несоблюдением условий доставки образцов в лабораторию, приемом пациентами антибиотиков перед проведением микробиологических исследований. К безусловным недостаткам микробиологического подхода также следует отнести длительность исследования — от момента взятия материала до идентификации выделенного в чистой культуре микроорганизма проходит от 3 до 7 суток, а в некоторых случаях — значительно более. Считается, что на догоспитальном этапе оказания медицинской помощи проведение микробиологических исследований с целью установления этиологии заболевания в большинстве случаев нецелесообразно [4, 7, 10]. У госпитализированных больных объем проводимых исследований определяется тяжестью их состояния, при этом микробиологические исследования должны проводиться обязательно. Стандартом является применение прямых методов: исследование мокроты методом микроскопии мазка, окрашенного по Граму, с последующим выделением культуры микроорганизма и определением чувствительности. У всех стационарных больных с внебольничной пневмонией также необходимо производить посевы крови. В тех слу-

чаях, когда показаны плевростомия или бронхоскопия, исследование такого клинического материала, как плевральная жидкость, ЖБАЛ, может значительно увеличить вероятность выделения возбудителя [10]. Несмотря на то, что в ряде публикаций было показано отсутствие влияния первичного микробиологического исследования на исход внебольничной пневмонии у госпитализированных больных [1], большинство клиницистов считает, что выявление возбудителя помогает в выборе этиотропной терапии, в особенности у пациентов с тяжелым течением заболевания.

В последние годы все шире стал применяться иммунологический подход, который позволяет выявлять специфические антитела классов IgM, IgG, IgA, их авидность (серологический метод), антигены микроорганизмов и специфический клеточный ответ. К достоинствам иммунологического подхода можно отнести скорость и высокую воспроизводимость результатов анализа, возможность стандартизации и автоматизации исследований, высокую пропускную способность при низкой стоимости исследований. Из недостатков такого подхода можно выделить низкую аналитическую чувствительность, что особенно актуально для прямых методов, а также необходимость в дополнительном использовании подтверждающих тестов. Для косвенных методов, к которым относится серологический метод, характерно несоответствие принципам причинной обусловленности ассоциации. Современная медицина располагает значительным опытом применения таких методов, как иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммунный анализ (РИА), иммунный блоттинг (ИБ), прямая и непрямая иммунофлюоресценция, и др. Эти методы позволяют выявлять антигены микроорганизмов (прямые методы) или специфические антитела к ним (непрямые или косвенные методы) в биологических жидкостях больного (моча, цельная кровь, сыворотка или плазма крови, слюна и т.д.). Простые быстрые тесты также основаны на использовании различных типов иммунологических реакций. В отличие от ИФА, РИА, иммунофлюоресценции и ИБ, быстрые тесты практически при тех же показателях чувствительности и специфичности, не нуждаются в использовании дорогостоящего специального оборудования. К преимуществам быстрых тестов относят также скорость получения результатов, простоту в использовании и невысокую стоимость, точность и надежность, гибкость в применении различных форматов тестов, простые условия хранения (2–30 °C). Большинство быстрых тестов представлены в виде комплекта и не требуют использования дополнительных реагентов. Так как процедура тестирования состоит из небольшого количества этапов и не требует высокой точности, существует меньшая вероятность ошибки, и поэтому действия могут быть произведены человеком без опыта работы в лаборатории. Такие тесты предусматривают визуальный учёт результатов. Их интерпретация обычно достаточно проста. Во многих быстрых тестах существует внутренний контроль, подтверждающий достоверность проведённого анализа. Предварительный результат может быть получен через несколько минут. Некоторые быстрые тесты

могут быть использованы в качестве подтверждающих, и дать ответ в тот же день. Фактически быстрые тесты являются «типовой мини лабораторией с одинаковой последовательностью операций», «тестом в кармане», «лабораторией в кармане», «упрощенным экспресс-тестом», «тестом на месте» или «тестом у постели больного». Быстрые тесты на основе иммунохроматографического анализа (ИХА-тесты) получили широкое распространение в гинекологии (определение хорионического гонадотропина), кардиологии (определение креатинкиназы), онкологии (определение простатоспецифического антигена), наркологии (определение наркотических веществ) и инфектологии (определение антигенов и антител к вирусам гепатита В и С, антигенов вирусов гриппа А и В, аденовирусов человека и др.). Принцип действия ИХА-теста состоит в том, что при его погружении в биологическую жидкость пациента (клинический материал) последняя начинает мигрировать вдоль полоски по принципу тонкослойной хроматографии. Вместе с биологической жидкостью движутся и антитела, конъюгированные с красителем (коллоидное золото). Если в клиническом материале присутствует исследуемый антиген (гормон, инфекционный или онкологический маркер), то происходит связывание, как с первым, так и со вторым типом антител. При этом происходит накопление антител с красителем вокруг антител, жестко фиксированных в тестовой зоне, что проявляется в виде окрашенной полоски. Свободные (несвязавшиеся) антитела с красителем мигрируют далее вдоль полоски и неизбежно взаимодействуют с вторичными антителами в контрольной зоне, где наблюдается вторая окрашенная (контрольная) полоса. Контрольная полоса должна проявляться всегда независимо от присутствия исследуемого маркера в биологическом материале (если анализ проведен правильно).

В практике пульмонолога ведущее значение имеют быстрые тесты для определения антигенов пневмококка и легионеллы в моче. Наиболее информативным в настоящее время является тест для выявления антигенов *Legionella* spp. в моче. Легионеллезная инфекция может протекать в двух основных клинических формах: лихорадка Понтиак– гриппоподобное заболевание с нетяжелым течением, не требующим лечения, и болезни легионеров — тяжелого мультисистемного заболевания с доминирующим поражением легких. Легионелла является возбудителем как внебольничной, так и госпитальной пневмонии. Эпидемиологические данные характеризуются значительной вариабельностью, поскольку могут регистрироваться как спорадические случаи, так и вспышки заболевания. К примеру, ежегодно в США регистрируют от 8000 до 18000 случаев легионеллезной инфекции [9]. Согласно данным, опубликованным Европейской рабочей группой по легионеллезной инфекции [13], общая заболеваемость для 33 стран континента в 2007 году составила 11,3 случая на 1 миллион населения. Значительная частота легионеллезных пневмоний отмечается в Италии (14,4), Франции (22,8) и Испании (24,8), тогда как на севере континента этот возбудитель определяется значительно реже (Финляндия — 5,3, Латвия — 0,9). Около 90 % всех случаев болезни легионеров в США связывают с *Legionella pneumophila* 1-го серотипа, из них подтверждаются культуральным методом либо выявлением антигенов в моче до 71 % случаев. В центре по контролю за инфекционными заболеваниями в США (CDC) считают, что 2–10 % случаев заболевания остаются неподтвержденными в связи с недостаточно полным обследованием больных.

Согласно международным руководствам по лечению инфекций нижних дыхательных путей рекомендуется использование ИХА-тестов для выявления антигенов *Legionella pneumophila* в моче у больных с нетяжелым течением при наличии эпидемиологических показаний, а также у всех госпитализируемых больных в ряду прочих методов обследования [4]. Быстрый ИХА-тест позволяет за 15 минут провести раннюю диагностику инфекции, вызванной *Legionella pneumophila* серогруппы 1, с помощью детекции специфического растворимого антигена, присутствующего в моче больных. В то же время другие серотипы или другие виды рода *Legionella* не выявляются, хотя перекрестная реактивность для них описана [3]. Данные тесты особенно ценны ввиду того, что выделение культуры *Legionella pneumophila* занимает около 3–4 суток и положительный результат экспресс-теста является наиболее ранним доказательством инфекции. Для ИХА-тестов чувствительность соответственно составляет 55,5 % для неконцентрированной мочи и 97,2 % для концентрированной мочи [8]. Для сравнения, чувствительность тест-систем для ИФА при исследовании неконцентрированной мочи составляет 63–67 %, а при исследовании концентрированной — 86–89 % [5]. Лидером в производстве быстрых тестов для определения антигенов легионелл в моче является компания *Binax*, США. Основным ограничением коммерческих тест-систем является выявление антигенов серотипа 1 *Legionella pneumophila*, являющегося наиболее распространенным при легионеллезной инфекции. Необходимо помнить, что в течение первых 3–5 суток от начала заболевания результат теста может быть ложноотрицательным [12].

Быстрый ИХА-тест для выявления пневмококковой инфекции основан на тех же принципах и предназначен для качественного выявления антигена *Streptococcus pneumoniae* в образцах мочи пациентов с симптомами пневмонии, менингита и ряда других заболеваний. Формат теста также аналогичен таковому, что и у легионеллезного теста. Заявленная чувствительность метода составляет 86 %, а специфичность — 94 %. Согласно данным независимых исследователей, чувствительность данного теста в сравнении с культуральным методом составляет около 80 %. Помимо этого, специфичность его значительно снижается при обследовании детей, у которых, в силу возможного носительства стрептококка, интерпретация положительных результатов затруднена. Использование быстрого ИХА-теста на пневмококк перспективно у пациентов, уже получающих системную антимикробную химиотерапию, поскольку предшествующий прием антибиотиков существенно снижает информативность культурального метода исследования, особенно при невозможности получения качественного образца мокроты. Следует помнить также и о том, что даже в том случае, когда возбудитель установлен (в том числе у постели больного с помощью быстрого теста), назначение антибактериального препарата узкого спектра действия может отрицательно отразиться на эффективности проводимого лечения, поскольку у 5–38 % больных заболевание может быть вызвано несколькими микроорганизмами (микст-инфекция).

Одним из косвенных методов выявления этиологии инфекционного процесса является серологический метод, основанный на определении специфических антител в плазме крови больного. Следует отметить, что рутинное использование серологических исследований при обследовании больных с инфекцией нижних дыхательных путей является необоснованным, так как не имеет практической пользы для курации

отдельно взятого больного. Тем не менее, в ряде случаев, для решения отдельных эпидемиологических задач, определение нарастания титров антител в парных сыворотках больных, перенесших инфекции, вызванные *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* и *Legionella pneumophila*, может быть целесообразным. В ситуации с данными возбудителями вследствие трудностей, связанных с выделением культуры, серологическое исследование может помочь верифицировать диагноз в значительно более ранние сроки. Наиболее достоверным доказательством текущей инфекции следует считать увеличение титров специфических антител класса IgG в паре сывороток, полученных от больного с интервалом 7–10 дней, либо появление IgM во втором образце сыворотки крови. При инфекции, вызванной *M. pneumoniae*, появление IgM отмечают не ранее чем через неделю от начала заболевания [6]. Иммунологический ответ при инфекциях, вызванных *Chlamydia pneumoniae* и *Legionella pneumophila*, развивается еще позже.

Новейшим подходом в этиологической диагностике инфекций нижних дыхательных путей, является генотипический, включающий в себя все специфические методы, направленные на анализ молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или рибонуклеиновой кислоты (РНК). Все шире используется выделение геномов возбудителей с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), а также ПЦР в реальном времени. К преимуществам метода ПЦР относятся высокая специфичность и чувствительность, возможность дифференциальной штаммовой диагностики, возможность быстрой идентификации возбудителя. Он позволяет обнаружить несколько копий геномной ДНК или РНК в исследуемом клиническом материале. Разработан вариант количественной ПЦР, позволяющий определить число копий амплифицируемого сайта ДНК. ПЦР в реальном времени является одним из самых современных методов и основан на количественной детекции флуоресцентного сигнала, который увеличивается пропорционально количеству копий ПЦР-продукта [1]. Следовательно, результат ПЦР в реальном времени можно регистрировать в процессе реакции в каждый момент времени. Методика проведения сложна, дорогостояща и пока недостаточно унифицирована для рутинного применения. Преимущества ПЦР в реальном времени: информацию о составе пробы и о ходе реакции можно получать, не открывая пробирку. Это ускоряет получение результата, снижает опасность контаминации. Наличие специфического зонда, комплементарного внутреннему участку фрагмента, дополнительно проверяет специфичность полученного фрагмента, снижает риск получения ложноположительных результатов. Регистрация интенсивности флуоресценции позволяет судить о количестве в пробе исходного инфекционного агента. Возможно проводить так называемую множественную ПЦР (мультиплексную ПЦР) и регистрировать в одной реакции несколько инфекционных агентов, используя разные флуоресцентные красители.

Разработаны протоколы идентификации *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis* и целого ряда респираторных вирусов. Однако чрезвычайно высокая чувствительность метода может поставить полученные результаты под сомнение: крайне сложно отличить активную инфекцию от колонизации или перенесенной инфекции. В настоящее время единственным амплификационным анализом для респираторных микроорга-

низмов, одобренным Управлением по контролю за медикаментами и продуктами питания США (Food and Drug Administration), является идентификация *Mycobacterium tuberculosis*.

Использование современных методов амплификации нуклеиновых кислот для этиологической диагностики вирусных инфекций оправдано, особенно в период эпидемий респираторных вирусных инфекций (чаще гриппа). Что касается бактериальных инфекций, вызываемых атипичными возбудителями, проведение ПЦР-диагностики может иметь большое клиническое значение при условии быстрого получения результатов.

Значительный интерес представляет использование ПЦР для определения возбудителей пневмонии, особенно в тех случаях, когда заболевание вызвано атипичными микроорганизмами. Это связано с трудностью выделения таких микроорганизмов, как *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella spp.* в культуре. Как следует из опубликованных данных, эффективность ПЦР в реальном времени для этих возбудителей по своей эффективности сопоставима с культуральными и серологическими методами.

S. pneumoniae, являющийся наиболее частой причиной внебольничной пневмонии, легко выявляется в выделениях больного при помощи молекулярно-биологических методов исследования. Продемонстрирована высокая чувствительность мультиплексной ПЦР в реальном времени для определения *S. pneumoniae* и *H. influenzae* в бронхо-альвеолярных смывах больных пневмонией [14]. Проблема с интерпретацией результатов на фоне стрептококкового носительства может отчасти быть решена путем количественного определения числа копий ДНК в препарате (quantitative real-time PCR) [15].

Являясь наиболее перспективными и обещающими, молекулярно-биологические методы пока находят ограниченное использование в пульмонологии. Место ПЦР в этиологической диагностике инфекций нижних дыхательных путей окончательно не определено, так как доступные тест-системы нуждаются в валидации, а полученные результаты не всегда однозначно согласуются с клиническим течением заболевания [1]. Несомненно, генотипический подход следует использовать в случае с атипичными возбудителями, а методики определения типичных патогенов инфекций нижних дыхательных путей должны быть усовершенствованы.

Обобщая современные данные, можно сделать вывод о том, что имеющиеся в арсенале современной лаборатории некультуральные методы идентификации возбудителей инфекций нижних дыхательных путей имеют достаточно высокую чувствительность и приемлемую специфичность. Вместе с тем, в силу целого ряда ограничений тех или иных методик, в рутинной клинической практике основным по-прежнему остается микробиологический подход с выделением культур микроорганизмов. К сожалению, пока только он позволяет не только установить этиологию инфекции, но и определить профиль резистентности микробов. Серологические, иммунологические и молекулярные тесты необходимо использовать как дополнительные. Наиболее обещающими в ближайшем будущем представляются молекулярные методы на основе качественного и количественного определения содержания ДНК/РНК микроорганизмов в биологических образцах больного. Постоянное совершенствование техники и методик проведения подобных исследований должно параллельно дополнять-

ся данными клинических исследований. Только такой тандем науки и практики способен обеспечить высокую эффективность диагностического процесса.

ЛІТЕРАТУРА

1. ПЦР в реальном времени [Текст] / под ред. Д. В. Ребриков. — Москва: Бином, 2009. — 223 с.
2. Чучалин, А. Г. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. Пособие для врачей [Текст] / А. Г. Чучалин, А. И. Синопальников, Р. С. Козлов, И. Е. Тюрин, С. А. Рачина. — Москва, 2010. — 84 с.
3. Benson, R. F. Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of Legionella [Text] / R. F. Benson, P. W. Tang, B. S. Fields. // J. Clin. Microbiol. — 2000. — Vol. 38. — P. 2763–2765.
4. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009 [Text] / W. S. Lim [et al.] // Thorax. — 2009. — Vol. 64, Suppl. III. — P. iii1–iii55.
5. Dominguez, J. A. Comparison of the Binax Legionella urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest Legionella Urin antigen EIA for detection of Legionella antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples [Text] / J. A. Dominguez [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1998. — Vol. 36. — P. 2718–2722.
6. Vikerfors, T. Detection of specific IgM antibodies for the diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infections: a clinical evaluation [Text] / T. Vikerfors [et al.] // Scand. J. Infect. Dis. — 1988. — Vol. 20. — P. 601–610.
7. ERS Guidelines for the management of adult Lower respiratory tract infections [Text] / M. Woodhead, F. Blasi, S. Ewig, G. Huchon, M. Ieven, A. Ortqvist, T. Schaberg, A. Torres, G. van der Heijden, T. J. M. Verheij // Eur. Respir. J. — 2005. — Vol. 26. — P. 1138–1180.
8. Dominguez, J. Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for the detection of Legionella antigen in urine samples [Text] / J. Dominguez [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 1999. — Vol. 18. — P. 896–898.
9. Marston, B. J. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization - results of a population-based active surveillance study in Ohio [Text] / B. J. Marston [et al.] // Arch. Intern. Med. — Vol. 157. — P. 1709–1718.
10. Mandell L. A. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults [Text] / L. A. Mandell [et al.] // Clinical Infectious Diseases. — 2007. — Vol. 44. — P. 27–72.
11. Initial microbiologic studies did not affect outcome in adults hospitalized with community-acquired pneumonia [Text] / S. Sanyal, P. R. Smith, A. C. Saha, S. Gupta, L. Berkowitz, P. Homel // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 1999. — Vol. 160. — P. 346–348.
12. Bernander, S. Legionella urinary antigen in early disease [Text] / S. Bernander [et al.] // Scand. J. Infect. Dis. — 1994. — Vol. 26. — P. 777–778.
13. Legionnaires' disease in Europe 2007–2008. Euro Surveillance [Электронный ресурс] / C. A. Joseph [et al.] Режим доступа: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19493>.
14. Multiplex quantitative PCR for detection of lower respiratory tract infection and meningitis caused by Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Neisseria meningitidis [Электронный ресурс] G. M. K. Abdeldaim [et al.]. Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/310>.
15. Espy, M. J. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing [Text] / M. J. Espy [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. — 2006. — Vol. 19, Suppl. 1. — P. 165–256.