

© Перцева Т. О., Кіреєва Т. В., Белослудцева К. О.  
УДК 616.24-002-06-02-032

## ОСОБЛИВОСТІ ЕТІОЛОГІЇ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗБУДНИКА У ХВОРИХ НА ТЯЖКУ НЕГОСПІТАЛЬНУ ПНЕВМОНІЮ\*

Перцева Т. О., Кіреєва Т. В., Белослудцева К. О.

Державна установа «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України».

*Важность идентификации возбудителя у больных тяжелой негоспитальной пневмонией (ТНП) не вызывает сомнения. Учитывая неоднородные данные о ведущей роли респираторных возбудителей в этиологии ТНП, а также о роли различных методов их идентификации целью работы было определить спектр возбудителей ТНП, а также эффективность использования такого некультурального метода исследования мокроты как мультиплексная ПЦР. Для этого было обследовано 62 больных с верифицируемой ТНП. Всем больным после госпитализации до назначения антибактериальной терапии проводилась идентификация этиологического возбудителя и определения ВИЧ-статуса. Согласно результатам исследования оказалось, что благодаря комбинации 2 методик исследования мокроты в целом этиология ТНП была определена в 61,2% случаев, при этом обозначились 3 кагорты больных: с выделенными Gr(+) бактериями, с выделенными Gr(-) бактериями и с выделенной оппортунистической флорой. По результатам анализа структуры идентифицированных бактериальных возбудителей всех больных ТНП преобладает пневмококк, нами была выявлена высокая частота оппортунистической и мультирезистентной Gr(-) флоры. В связи с высоким риском атипичной и Gr(-) этиологии ТНП идентификация респираторных возбудителей должна быть включена в перечень обязательных мероприятий диагностического алгоритма при этой патологии. «Золотым стандартом» идентификации респираторных возбудителей у больных ТНП остается микробиологическое исследование с выявлением чувствительности к антибактериальным препаратам, однако при невозможности его проведения, а также при подозрении на наличие атипичных возбудителей эффективным ориентировочным, однако быстрым, методом является использование ПЦР-исследования мокроты.*

**Ключевые слова:** тяжелая внебольничная пневмония, этиология, возбудители

Актуальність проблеми ведення хворих на тяжку негоспітальну пневмонію (ТНП) не викликає сумніву і обумовлена постійним ростом захворюваності й летальності при цій патології як в нашій країні так і у всьому світі [3, 9, 15, 17]. Постійне зростання кількості негоспітальних пневмоній тяжкого перебігу протягом останніх років деякі дослідники пов'язують, перш за все, зі зміною етіологічної структури цього захворювання, а саме зі збільшенням частоти зустрічальності стафілококів, легіонел і грамнегативних (Gr(-)) мікроорганізмів, які призводять до більш тяжкого перебігу захворювання [1, 2, 16].

Згідно з літературними даними, провідна етіологічна роль при ТНП відводиться таким мікроорганізмам, як *Staphylococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) (у 30% випадків), *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) (у 1–15% випадків), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (у 7–8% випадків), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (у 10–15% випадків), родина *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Proteus*) (у 22% випадків) [1, 18]. Досить рідко ТНП викликає *Haemophilus influenza* (*H. influenza*) (у 4–5% випадків), атипіві збудники *Mycoplasma Pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) (у 2–2,5% випадків), віруси (у 5% випадків) [20, 21]. Найбільш частими збудниками пневмонії, що закінчується летально, є *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* і *H. influenzae* (31,4, 28,6, 12,9 і 11,4% випадків від усіх виділених штамів відповідно) [5].

Крім того, постійно відбувається збільшення пневмонії у осіб, що страждають різними імунодефіцитними станами не тільки за рахунок постійного збільшення ВІЛ-позитивних пацієнтів [19], а також станів, що

приводять до зниження активності клітинного імунітету (цукровий діабет, алкоголізм, онкологічні захворювання тощо) [4, 7]. Найбільш частими збудниками таких пневмоній є *S. aureus*, *Streptococcus viridians*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus anhaemolyticus*, *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*), *Cytomegalovirus*, гриби роду *Candida*, *Aspergillus*, віруси, а також *L. pneumophila*, *Mycobacterium avium-intercellulare*, *Enterobacteriaceae* [8, 10].

З огляду на вищезазначене, необхідно підкреслити важливість ідентифікації збудника саме у хворих на ТНП для можливості індивідуалізації антибактеріальної терапії (АБТ). Однак, російські експерти в області пульмонології вказують на те, що етіологію НП не вдається встановити у 40–60% пацієнтів [1, 14]. Відсутність продуктивного кашлю у ослаблених хворих при пригніченні кашльового рефлексу, неадекватність вимогам посіву біологічного матеріалу, широке нераціональне застосування антибіотиків на догоспітальному етапі, недотримання правил збору, зберігання і доставки харкотиння, тривалість виконання, неможливість ідентифікації внутрішньоклітинних збудників – найважливіші причини негативного результату мікробіологічного дослідження експекторанта.

У той же час існують дані про те, що, завдяки застосуванню комбінації сучасних методів діагностики, ідентифікацію збудника ТНП можна приблизити до 80% [2]. За наявності ТНП, коли швидкий пошук етіологічного агента виходить на перший план, актуальним є впровадження у медичну практику швидких, універсальних, високоспецифічних експрес-методів діагностики респираторних збудників, до яких відноситься експрес-тестування харкотиння за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції

\* Цитування при атестації кадрів: Т. О. Перцева, Т. В. Кіреєва, К. О. Белослудцева.. Особливості етіології та ідентифікації збудника у хворих на тяжку негоспітальну пневмонію // Проблеми екології і медицини. – 2014. – Т. 18, № 1-2. – С. 26–29

(ПЛР) [22]. Завдяки цьому методу можна за лічені години виявити не тільки типових збудників ТНП, а і внутрішньоклітинних мікроорганізмів та пневмоцисту [11].

Враховуючи неодноголосні дані про провідну роль респіраторних збудників в етіології ТНП, а також про роль різних методів їх ідентифікації метою роботи було визначити спектр збудників ТНП у нашому регіоні, а також ефективність використання такого некультурального методу дослідження харкотиння як мультиплексна ПЛР у хворих цієї категорії.

**Матеріали і методи дослідження**

Нами було обстежено 62 хворих на верифіковану (згідно критеріям Наказу МОЗ України №128 від 19.03.2007 р. [12]) ТНП, котрі склали основну групу. Всім хворим після госпіталізації до призначення АБТ проводилась ідентифікація етіологічного збудника та визначення ВІЛ-статусу, згідно з результатами яких хворі на ТНП були розподілені на групи та підгрупи:

- група 1, в яку увійшли 51 хворий на ТНП без супутньої ВІЛ-інфекції, розподілені на підгрупи згідно з етіологічним чинником:
- підгрупа А – 17 хворих на ТНП (середній вік – 57,5±4,3 років, чоловіків – 13 (76,5%)) з виділеними Гр(+) бактеріями;
- підгрупа В – 10 хворих на ТНП (середній вік – 50,2±5,2 років, чоловіків – 7 (70,0%)) з виділеними Гр(-) бактеріями;
- група 2, в яку увійшли 11 хворих на ТНП (середній вік – 35,8±2,5 років, чоловіків – 4 (36,4%)) з супутньою ВІЛ-інфекцією.

Оцінка ВІЛ-статусу проводилась шляхом експрес-тестування крові хворих за допомогою СІТО TEST HIV 1/2 («Фармаско», Україна).

Ідентифікацію збудників у харкотинні, індукованому харкотинні або бронхоальвеолярному змиві проводили методом мікробіологічного дослідження матеріалу та методом визначення ДНК бактерій методом ПЛР. Для цього проводився забір спонтанно експекторованого чи індукованого харкотиння вранці натще після попереднього очищення хворими зубів та ротової порожнини полосканням кип'яченою водою. Індукування харкотиння проводилося шляхом попередньої інгаляції через небулайзер гіпертонічного (3–5%) розчину хлориду натрію протягом 7–10 хвилин з наступним прополіскуванням порожнини рота і експекторацією виділень. Збір бронхоальвеолярного змиву проводився під час діагностичної або санаційної бронхоскопії. Термін доставки діагностичного матеріалу в лабораторію становив не більше 2 годин при зберіганні матеріалу при звичайних умовах.

Для проведення культурального бактеріологічного дослідження харкотиння з ідентифікацією патогенного збудника захворювання використовували класичні живильні середовища. Чутливість мікроорганізмів оцінювалась диско-дифузійним методом.

Ідентифікація ДНК *S. pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* (*N. Meningitidis*), *H. influenza*, *L. pneumophila*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *P. jirovecii* проводилась методом мультиплексної ПЛР за допомогою наборів реагентів серії «МультиПрайм» («ІнтерЛабСервис», Росія) для одномоментної ампліфікації ДНК *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. Influenza*, для одномоментної ампліфікації ДНК *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* та за допомогою специфічного праймера pAZ102E для ампліфікації ДНК

*P. jirovecii* з використанням біоаналізатора Agilent 2100 («Agilent Technologies», США).

Усі хворі дали письмову згоду на проведення досліджень.

Статистична обробка отриманих результатів досліджень проводилась з використанням методів біометричного аналізу, що реалізовані у пакетах програм EXCEL-2003 (№ 74017-641-9475201-57075) та STATISTICA 6.0 (№ 31415926535897) [6, 13].

**Результати та їх обговорення**

За результатами дослідження виявилось, що завдяки комбінації 2 методик дослідження харкотиння загалом етіологію ТНП було визначено у 61,2% випадків, при цьому окреслились 3 кагорти хворих: з виділеними Гр(+) бактеріями, з виділеними Гр(-) бактеріями та з виділеною опортуністичною флорою (рис. 1), що полягло до основи принципу розподілу хворих на групи та підгрупи.

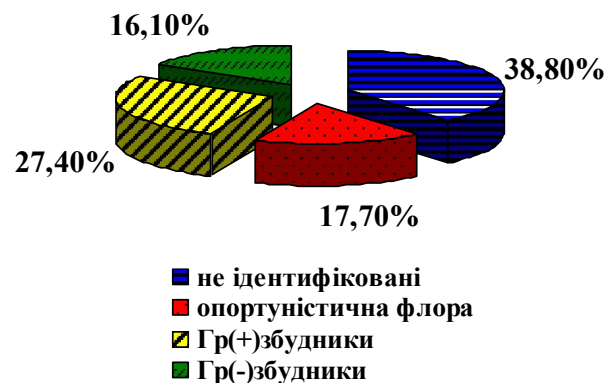


Рис. 1. Структура ідентифікованих збудників у хворих на ТНП

Що стосується пацієнтів групи 1, серед 51 хворого без ВІЛ-інфекції збудник було ідентифіковано у 27 (52,9%) випадках (табл. 1).

Таблиця 1  
Ідентифіковані збудники у хворих групи 1, абс. (%)

Вид мікроорганізму	Група 1 (n=51)
<i>S. aureus</i>	5 (18,5)
<i>S. pneumoniae</i>	12 (44,4)
<i>K. pneumoniae</i>	3 (11,1)
<i>P. aeruginosa</i>	3 (11,1)
<i>N. meningitides</i>	2 (7,5)
<i>Acinetobacter</i>	1 (3,7)
<i>Enterobacteriaceae</i>	1 (3,7)
<i>P. jirovecii</i>	-
<i>C. pneumoniae</i>	-
<i>M. pneumoniae</i>	-
<i>L. pneumophila</i>	-
Загалом	27

При цьому у 17 (62,9%) хворих, які склали підгрупу А, виділились Гр(+) бактерії (*S. pneumoniae* (n=11), *S. aureus* (n=6)) (рис. 2).

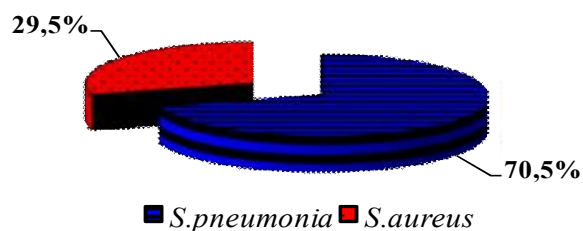


Рис. 2. Структура ідентифікованих збудників у хворих на ТНП підгрупи А

У підгрупу В увійшли 10 (19,6%) хворих, у яких виділились Гр(-) бактерії (*P. aeruginosa* (n=3), *K. pneumonia* (n=3), *N. meningitides* (n=2), *Acinetobacter* (n=1), *Enterobacteriaceae* (n=1)) (рис. 3).

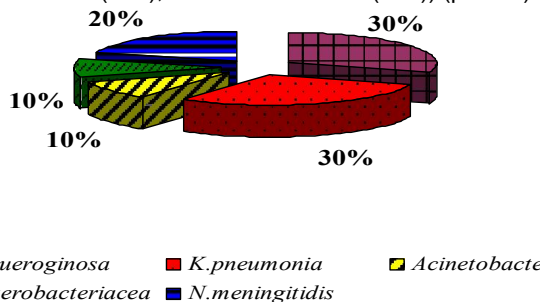


Рис. 3. Структура ідентифікованих збудників у хворих на ТНП підгрупи В

За результатами аналізу структури ідентифікованих бактеріальних збудників у 27 хворих групи 1, виявилось, що майже у половині випадків було виявлено *S. pneumoniae* (табл. 1). Привертає увагу висока частота ідентифікації Гр(-) збудників, які зустрілись у 10 (37,0 %) випадках.

Отримані результати про перевагу пневмокока, золотистого стафілокока, клебсієли, синьогнійної палички у структурі етіологічних збудників ТНП співпадають з іншими даними вітчизняних науковців. Тоді як виявлення *N. meningitidis*, *Enterobacteriaceae* та *Acinetobacter* у якості етіологічного чинника потребує обговорення.

Згідно літературним даним, менінгококова ДНК може виділятися методом ПЛР у пацієнтів із назофарингеальним бактеріоносійством цього збудника, що не вказує на етіологію ТНП. Втім, враховуючи тяжкий перебіг пневмонії у даних хворих і ефективність АБТ з включенням препаратів, що мають високу активність проти Гр(-) флори, можна стверджувати, що *N. meningitidis* виступав у якості збудника ТНП.

*Enterobacteriaceae* та *Acinetobacter* можна розглядати як внутрішньолікарняну інфекцію, що приєдналась у процесі забору харкотиння. Втім, враховуючи, що біологічний матеріал у даних хворих було зібрано ще до використання апаратів дихальної підтримки у одноразовий посуд, що майже виключає контамінацію, можна вважати, що ці мікроорганізми також виступали етіологічним агентом у даних хворих на ТНП.

Слід також зауважити, що жодного випадку виявлення атипичних внутрішньоклітинних збудників ТНП (*S. pneumoniae*, *M. pneumoniae* та *L. pneumophila*) методом ПЛР не спостерігалось.

При аналізі діагностичної значущості методів діагностики етіологічних факторів ТНП, що були використані у нашому дослідженні, виявилось, що із 27 штамів мікроорганізмів, котрі були ідентифіковані у хворих групи 1, 8 штамів було виділено тільки методом

мікробіологічного дослідження (*S. aureus* (n=5), *P. aeruginosa* (n=3), *K. pneumonia* (n=3), *Acinetobacter* (n=1), *Enterobacteriaceae* (n=1)), 15 – тільки методом ПЛР (*S. pneumoniae* (n=13), *N. meningitides* (n=2), 4 – обома методами одночасно (*S. pneumoniae* (n=4)).

Треба звернути увагу на те, що пневмокок методом ПЛР виділювався у всіх випадках його загального виявлення, а мікробіологічним – тільки у 4 (23,5%) із 17 випадків. Іншими перевагами методу мультиплексної ПЛР були низька вибагливість до кількості харкотиння, отримання результату протягом доби та можливість верифікації внутрішньоклітинних збудників. Втім, неможливість виявлення Гр(-) мікроорганізмів, відсутність інформації про чутливість патогена до антибактеріального препарату, можливість хибно-позитивних результатів виступили основними недоліками методу. Таким чином, зіставлення різних методів ідентифікації респіраторних збудників не має чинності, тоді як розумний вибір та їхня комбінація виходять на перший план у край тяжких хворих на негоспітальну пневмонію.

Що стосується чутливості респіраторних збудників до антибактеріальних препаратів у 4 хворих за результатами мікробіологічного дослідження харкотиння були ідентифіковані *S. aureus*, *S. pneumoniae*, чутливі лише до моксифлоксацину та карбопенемів, у 3 хворих за результатами мікробіологічного дослідження харкотиння було ідентифіковано *K. pneumonia*, слабо чутливу тільки до іміпенему, що вказує на досить високий ступінь мультирезистентності респіраторних збудників ТНП без супутньої ВІЛ-інфекції.

Що стосується хворих групи 2 за результатами ідентифікації збудника виявити етіологічний фактор вдалось у 100% випадків. Абсолютно переважала пневмонія, що викликана *P. jirivecii* (n=9), тоді як у інших осіб (n=2) було ідентифіковано пневмокок (рис. 4).

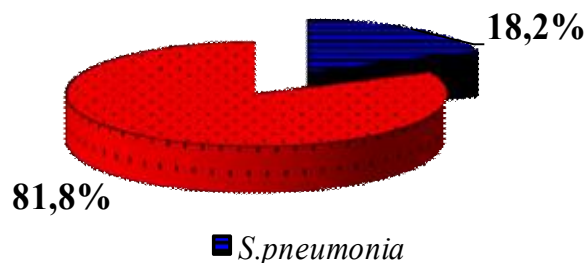


Рис. 4. Структура ідентифікованих збудників у хворих групи 2

При цьому всі штами були виявлені у харкотинні (у 2 (18,2%) випадках) та індукованому харкотинні (у 9 (81,8%) випадках) за допомогою методу ПЛР, перевагами якого була можливість верифікації атипичного опортуністичного збудника *P. jirivecii*, причому у невеликих за кількістю зразках біологічного матеріалу.

### Висновки

1. Не дивлячись на те, що, у структурі ідентифікованих бактеріальних збудників усіх хворих на ТНП Дніпропетровського регіону переважає пневмокок, нами було виявлено високу частоту опортуністичної (у 11 (17,7%) випадках) та мультирезистентної Гр(-) (у 10 (16,1%) випадках) флори.

2. У зв'язку з високим ризиком атипової та Гр(-) етіології ТНП ідентифікація респіраторних збудників повинна бути включена до обов'язкових заходів діаг-

ностичного алгоритму при цій патології, сприяти чому може індукція харкотиння та забір змивних вод під час санаційної чи діагностичної бронхоскопії.

3. «Золотим стандартом» ідентифікації респіраторних збудників у хворих на ТНП залишається мікробіологічне дослідження з виявленням чутливості до антибактеріальних препаратів, втім при неможливості його проведення, а також при підозрі на наявність атипичних збудників ефективним орієнтовним, проте швидким, методом є використання ПЛР-дослідження харкотиння.

4. У ВІЛ-інфікованих хворих на ТНП на перше місце при верифікації етіологічного збудника виходить ПЛР-дослідження індукованого харкотиння.

### Література

1. Авдеев С. Н. Тяжелая внебольничная пневмония / С. Н. Авдеев, А. Г. Чучалин // Русский медицинский журнал. – 2001. – Т. 9. – № 5. – С. 1–11.
2. Аверьянов А. В. Антибактериальная терапия внебольничной пневмонии тяжелого течения / А. В. Аверьянов // Участковый терапевт. – 2008. – № 4 – С. 2–3.
3. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. Пособие для врачей / А. Г. Чучалин, А. И. Синопальников, Р. С. Козлов. – Москва, 2010. – 146 с.
4. Гемелюк И. Ю. Клинико-иммунологические особенности и антибактериальная химиотерапия пневмоний при вторичных иммунодефицитных состояниях : автореф. ...канд. мед. н. – Самара, 2005. – 19 с.
5. Иванчик Н. В. Этиология фатальных внебольничных пневмоний у взрослых / Н. В. Иванчик, С. Н. Козлов, С. А. Рачина // Пульмонология. – 2008. – № 6. – С. 53–58.
6. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Губенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с. – ISBN 966-7632-16-4. МедиаСфера, 2002. – 312 с.
7. Нейко Є. М. Деякі імунологічні критерії звичайного та затяжного перебігу пневмоній / Є. М. Нейко, М. М. Островський // Український пульмонологічний журнал – 2002. – № 2. – С. 32–34.
8. Новиков Ю. К. Грамотрицательные пневмонии / Ю. К. Новиков // Русский медицинский журнал. – 2004. – № 2. – С. 7–9.
9. Нудьга А. Н. Тяжелые пневмонии с фатальным исходом (анализ течения, особенности) / А. Н. Нудьга, Е. А. Ковалева, В. А. Галинская // Медицина неотложных состояний. – 2006. – №5(6). – С. 10–16.
10. Особенности течения, диагностики и лечения пневмонии при наличии модифицирующих факторов : практи-

- ческое пособие / Т. А. Перцева [и др.]. – Киев, 2012. – 69 с.
11. Пневмоцистоз – актуальная иммунодефицит-ассоциированная инфекция (эпидемиология, клиника, диагностика и лечение) : методическое пособие / Н. В. Каражас, Т. Н. Рыбалкина, М. Н. Корниенко. – Москва, 2010. – 51 с.
  12. Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Пульмонологія» : Наказ МОЗ України № 128 від 19.03.2007 р. – Київ, 2007. – 146 с.
  13. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2002. – 312 с.
  14. Синопальников А. И. Новые рекомендации по ведению взрослых пациентов с внебольничной пневмонией: диагностика, оценка степени тяжести, антибактериальная терапия, профилактика (По материалам рекомендаций Американского торакального общества, 2001 г.) / А. И. Синопальников, Л. С. Страчунский, О. В. Сивая // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т. 3. – № 4. – С. 355–370.
  15. Фещенко Ю. І. Негоспітальна пневмонія у дорослих осіб: етіологія, патогенез, класифікація, діагностика, антибактеріальна терапія (проект клінічних настанов) / Ю. І. Фещенко, О. А. Голубовська, К. А. Гончаров // Український пульмонологічний журнал. – 2012. – № 4. – 132 с.
  16. Яковлев С. В. Тяжелая внебольничная пневмония. В кн.: Пневмония : Под ред. А. Г. Чучалина, А. И. Синопальникова, Н. Е. Чернеховской. – Москва, 2002. – 266 с.
  17. American Thoracic Society. Guidelines for the initial management of adults with community-acquired pneumonia: Diagnosis, assessment of severity, and initial antimicrobial therapy // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2001. – Vol. 163. – P. 1730–1754.
  18. An emergency department based randomized trial of nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage for early pathogen identification in severe community-acquired pneumonia / R. Rodriguez [et al.] // The Journal of Emergency Medicine. – 2001. – Vol. 38. – P. 357–363.
  19. Cohen J. HIV Infections and AIDS Deaths Dropping, But Epidemic Still Dauntingby / J. Cohen // Science Insiderer. – 2012. – Vol. 5. – P. 12–15.
  20. El-Solh A. A. Etiology of severe pneumonia in the very elderly / A. A. El-Solh, P. Sikka, F. Ramadan // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2001. – Vol. 163. – P. 645–651.
  21. Luna C. M. Community-acquired pneumonia: etiology, epidemiology, and outcome in teaching hospital in Argentina / C. M. Luna, A. Famiglietti, R. Absi // Chest. – 2000. – Vol. 118. – P. 1344–1354.
  22. Pozzetto B. Multiplex PCR theranostics of severe respiratory infections / B. Pozzetto // Expert Review of Anti-infective Therapy. – 2010. – Vol. 8(3). – P. 251–253.

## ENGLISH VERSION: FEATURES OF ETIOLOGY AND PATHOGEN IDENTIFICATION IN PATIENTS WITH SEVERE COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIA\*

Pertseva T., Kireeva T., Bielosludtseva K.

State establishment "Dnipropetrovsk medical academy of the Health Ministry of Ukraine",

*The importance of identifying the causative agent in patients with severe community-acquired pneumonia (CAP) is out of doubt. Different data on the leading role of respiratory pathogens in the etiology of severe CAP are presented, as well as the roles of the various methods of their identifying. The aim of the study was to determine the spectrum of pathogens of severe CAP, as well as the effectiveness of the use of such non-culture method of sputum as multiplex PCR. To do this 62 patients with verifiable severe CAP were examined. Identification of the etiologic pathogen and HIV status for all patients were performed after hospitalization before prescribing of antibiotic therapy. According to the study it was found that due to a combination of two methods of sputum diagnostic etiology of severe CAP was identified in 61.2% of all cases. There were designated 3 cohorts of patients: with identified Gr(+) bacteria, with identified Gr(-) bacteria and with identified opportunistic flora. According to the analysis of the structure of bacterial pathogens from all identified patients with severe CAP pneumococcus prevails, we revealed a high frequency of opportunistic and multiresistant Gr(-) flora. Due to the high risk of atypical and Gr(-) flora as respiratory pathogens of severe CAP identification of its etiology should be included in the list of mandatory measures in diagnostic algorithm at this pathology. "Gold standard" for identification of respiratory pathogens in patients with severe CAP microbiological research with revealing sensitivity to antibiotics remains, but if it cannot be conducted, as well as by suspected atypical pathogens using of sputum PCR is an efficient approximate, but fast method.*

**Keywords:** severe community-acquired pneumonia, etiology, pathogens

There is no doubt about relevance of management of patients with severe community acquired pneumonia (CAP) due to constant rise of its morbidity and mortality in our country and around the world [3, 9, 15, 17]. Because of constant increase of severe CAP in recent years, some researchers have attributed it most of all to changing of etiological patterns of the disease, namely to increase of the frequency in occurrence of staphylococci, Legionella and gram-negative (Gr (-)) are microorganisms that lead to more severe course of the disease [1, 2, 16].

According to the literature, the leading etiologic role in severe CAP play such microorganisms as *Staphylococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) (approximately 30% of cases), *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) (1–15% of cases), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (7–8% of cases), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (10–15% of cases), the family of *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Proteus*) (22% of cases) [1, 18]. Rarely severe CAP is caused by *Haemophilus influenza* (*H. influenza*) (4–5% of cases), atypical pathogens *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) (2–2.5% of cases), viruses (5% of cases) [20, 21]. The most common pathogens of fatal pneumonia are *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* and *H. influenzae* (31.4, 28.6, 12.9 and 11.4% of all isolates respectively) [5].

In addition, there is a steady increase of pneumonia in patients suffering from various immunodeficiency states, not only due to the continuous increase in HIV-positive patients [19] but also due to conditions that lead to a reduction in the activity of cellular immunity (diabetes, alcoholism, cancer, etc.) [4, 7]. The most common causative agents of such severe CAP are *S. aureus*, *Streptococcus viridians*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus ryogenes*, *Streptococcus anhaemolyticus*, *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*), *Cytomegalovirus*, *Candida* fungi,

*Aspergillus*, viruses, *L. pneumophila*, *Mycobacterium avium-intercellulare*, *Enterobacteriaceae* [8, 10].

In view of the above, we want to draw attention to the importance of identifying the pathogen in patients with severe CAP for opportunities of individualization of antibiotic therapy (ABT). However, Russian experts in the field of pulmonology indicate that the etiology of severe CAP can not be determined in 40–60% of patients [1, 14]. Lack of productive cough in patients with weakened inhibition of cough reflex, inadequate requirements of biological material, widely irrational use of antibiotics in out-patient, violation of the rules for collecting, storing and shipping of specimens, long time diagnostic, the inability to identify intracellular pathogens are the most important reason for the negative results of microbiological studies of expectorant.

At the same time, there is evidence that in case of combination of modern diagnostic methods, identification of the causative agent of severe CAP can bring closer to 80% [2]. In the presence of severe CAP as a quick search of the etiological agent comes to the fore, it is important to introduce fast, versatile, highly specific methods for rapid diagnosis of respiratory pathogens into medical practice, which include the rapid testing of specimens using multiplex polymerase chain reaction (PCR) [22]. This method makes possible to detect in few hours common pathogens of severe CAP including intracellular microorganisms and *Pneumocystis* [11].

Given different data about the leading role of respiratory pathogens in the etiology of severe CAP, as well as the role of the various methods of their identifying the aim of the work was to determine the spectrum of pathogens in patients with severe CAP in our region, and efficiency of such method of nonculture sputum diagnostic as multiplexed PCR in patients of this category.

### Materials and methods

We have examined 62 patients with verified (according to the criteria of the Order of the Ministry of Health of Ukraine №128 as of 19.03.2007 [12]) severe CAP, which

\* To cite this English version: T. Pertseva, T. Kireeva, K. Bielosludtseva. Features of etiology and pathogen identification in patients with severe community acquired pneumonia - / / Problemy ekologii ta medytsyny. - 2014. - Vol 18, № 1-2. - P. 30 -33.

accounted to the main group. All patients after admission before appointment of ABT underwent etiological agent identification and determination of HIV status, according to the results of which they were divided into groups and subgroups:

- group 1, which included 51 patient with severe CAP without HIV infection, divided into subgroups according to the etiological factor:

- subgroup A – 17 patients with severe CAP (mean age –  $57,5 \pm 4,3$  years, men – 13 (76.5%)) with isolated Gr(+) bacteria;

- subgroup B – 10 patients with severe CAP (mean age –  $50,2 \pm 5,2$  years, men – 7 (70.0%)) with isolated Gr(-) bacteria;

- group 2, which included 11 patients with severe CAP (mean age –  $35,8 \pm 2,5$  years, men – 4 (36.4%)) with HIV infection.

Assessment of HIV status was performed by rapid testing of patients using CITO TEST HIV 1/2 ("Pharmas-co", Ukraine).

Identification of pathogens in sputum, induced sputum or bronchoalveolar washings performed by microbiological research material and method for determining bacterial DNA by PCR. For this spontaneous or induced sputum was carried in the morning on an empty stomach after pre-treatment of the patients teeth and rinsing the mouth with boiled water. Induction of sputum was carried out by prior inhalation of nebulized of hypertonic (3–5%) sodium chloride solution during 7–10 minutes, followed by rinsing the mouth and sputum collection.

Collection of bronchoalveolar flush performed during diagnostic or sanation bronchoscopy. Delivery of diagnostic material in the laboratory was not more than 2 hours with material stored under normal conditions.

For the culture and identification of pathogenic causative agent in sputum we used classical culture media. The sensitivity of microorganisms was evaluated by disco-diffusion method.

Identification of DNA of *S. pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), *H. influenza*, *L. pneumophila*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *P. jirovecii* was performed by multiplex PCR using kits of series "Multy-Praym" ("YnterLabServys", Russia) for one-stage DNA amplification of *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenza*, for one-stage DNA amplification of *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* and by using specific primers to amplify DNA pAZ102E of *P. jirovecii* using bio-analyzer Agilent 2100 («Agilent Technologies", United States).

All patients gave written consent for research.

Statistical analysis of the results of research was carried out by the methods of biometric analysis, implemented in software packages EXCEL-2003 (№ 74017-641-9475201-57075) and STATISTICA 6.0 (№ 31415926535897) [6, 13].

### Results and discussion

The study proved that due to the combination of two methods of sputum diagnostic the etiology of severe CAP was identified in 61.2% of cases, with apparent 3 cohorts of patients: with isolated Gr(+) bacteria, with isolated Gr(-) bacteria and isolated opportunistic flora (Fig. 1), which underlay the principle of patients' dividing into groups and subgroups.

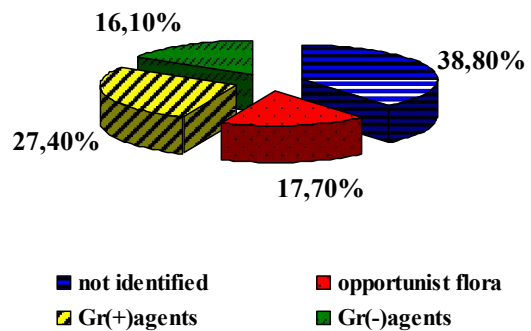


Fig. 1. Structure of identified pathogens in patients with severe CAP

As for the patients of group 1, among the 51 patients without HIV infection pathogens were identified in 27 (52.9%) cases (Table 1).

Table 1  
Identified pathogens in patients of group 1, abs. (%)

Agent	Group 1 (n=51)
<i>S. aureus</i>	5 (18,5)
<i>S. pneumoniae</i>	12 (44,4)
<i>K. pneumoniae</i>	3 (11,1)
<i>P. aeruginosa</i>	3 (11,1)
<i>N. meningitidis</i>	2 (7,5)
<i>Acinetobacter</i>	1 (3,7)
<i>Enterobacteriaceae</i>	1 (3,7)
<i>P. jirovecii</i>	-
<i>C. pneumoniae</i>	-
<i>M. pneumoniae</i>	-
<i>L. pneumophila</i>	-
Total	27

Thus in 17 (62.9%) patients included in subgroup A, Gr(+) bacteria (*S. pneumoniae* (n = 11), *S. aureus* (n = 6)) were identified (Fig. 2).

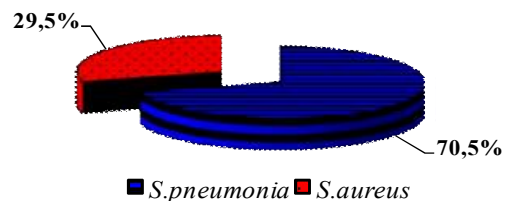


Fig. 2. Structure of identified pathogens in patients with severe CAP of subgroup A

Subgroup B included 10 (19.6%) patients in whom Gr(-) bacteria (*P. aeruginosa* (n=3), *K. pneumoniae* (n=3), *N. meningitidis* (n=2), *Acinetobacter* (n=1), *Enterobacteriaceae* (n=1)) were detected (Fig. 3).

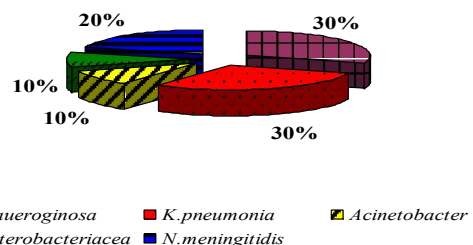


Fig. 3. Structure of identified pathogens in patients with severe CAP of subgroup B

According to the analysis of the structure of identified bacterial pathogens in 27 patients of group 1, it was found that almost in a half of cases *S. pneumoniae* was detected (Table 1). Attention is drawn by high frequency

of Gr(-) pathogens identification, which were diagnosed in 10 (37.0%) of cases.

The results about the superiority of pneumococcus, *S. aureus*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa* in the structure of the etiologic agents of severe CAP consistent with other data of domestic scientists, while the detection of *N. meningitides*, *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter* as an etiologic factor needs discussion.

According to the literature, meningococcal DNA can be recovered by PCR in patients with nasopharyngeal bacteria carrier state of this pathogen that does not indicate the etiology of severe CAP. However, given the state of severe course in these patients and the effectiveness of ABT with high activity against Gr(-) flora, it can be argued that *N. meningitides* acted as the causative agent of severe CAP.

*Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter* can be considered as nosocomial infections, which joined in the taking of specimens. However, given that biological materials in these patients were collected before the use of respiratory support devices in disposable tableware, which almost eliminates contamination, we can assume that these organisms were also etiologic agents in these patients with severe CAP.

It should also be noted that no cases of atypical intracellular pathogens (*C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* and *L. pneumophila*) by PCR were observed.

During the analysis of the diagnostic value of diagnostic methods of etiologic factors in patients with severe CAP that were used in this study, it was found that out of 27 strains of microorganisms that have been identified in patients of group 1, 8 strains were identified only by microbiological studies (*S. aureus* (n=5), *P. aeruginosa* (n=3), *K. pneumonia* (n=3), *Acinetobacter* (n=1), *Enterobacteriaceae* (n=1)), 15 strains – only by PCR (*S. pneumoniae* (n=13), *N. meningitides* (n=2), 4 strains – by both methods simultaneously (*S. pneumoniae* (n=4)).

It is necessary to point out that the pneumococcus was isolated by PCR in all cases of its overall detection and by microbiological – only 17 4 (23.5%) out of cases. Other advantages of the multiplex PCR were low intelligibility to the number of specimens, obtaining results within a day and the possibility of verification of intracellular pathogens. However, the inability to identify a lot of Gr(-) microorganisms, lack of information about pathogen susceptibility to antibiotics, the possibility of false-positive results were the main disadvantages of the method. Thus, a comparison of different methods for identification of respiratory pathogens has no effect, while the smart choice and their combination come to the fore in severe patients with CAP.

Regarding the sensitivity of respiratory pathogens to antibiotics in 4 patients the results of microbiological examination of sputum were identified *S. aureus*, *S. pneumonia* which sensitive only to moxifloxacin and carbopenems, in 3 patients the results of microbiological examination of sputum were identified as *K. pneumonia* which was weakly sensitive only to imipenem, indicating a fairly high degree of respiratory pathogens multiresistance in patients with severe CAP without HIV infection.

As for the patients in group 2 the results of the identification of the pathogen reveal the etiologic agent succeeded in 100% of cases. Absolutely dominated pneumonia caused by *P. jirivecii* (n=9), whereas others (n=2) were identified as pneumococcus (Fig. 4).

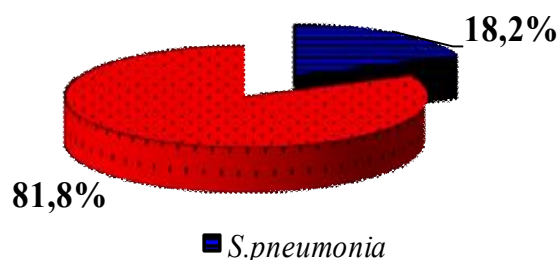


Fig. 4. Structure of identified pathogens in patients of group 2

Moreover, all strains were found in the sputum (in 2 (18.2%) cases) and induced sputum (in 9 (81.8%) cases) using PCR, the advantages of which was the possibility of verification atypical opportunistic pathogen *P. jirivecii* and in small number of samples of biological material.

### Conclusions

1. In spite of the fact that *S. pneumoniae* dominated in the structure of all bacterial pathogens identified at patients with severe CAP in Dnipropetrovsk region, we found a high frequency of opportunistic (in 11 (17.7%) cases) and multiresistant Gr(-) (10 (16.1%) cases) flora.

2. Due to high risk of atypical and Gr(-) respiratory pathogens in patients with severe CAP identification of its etiology should be included in the mandatory measures of the diagnostic algorithm at this pathology, aided to sputum induction and flush water intake during sanation or diagnostic bronchoscopy.

3. "Gold standard" of respiratory pathogens identification in patients with severe CAP is microbiological research with identification of susceptibility to antibiotics, however with the inability of it, as well as by suspected atypical pathogens the use of sputum PCR is efficient approximate but rapid method.

4. PCR studies of induced sputum are on the first place in the verification of etiologic pathogen in HIV-infected patients with severe CAP.

### References

1. Avdeev S. N. Tjazelaja vnebol'nichnaja pnevmonija / S. N. Avdeev, A. G. Chuchalin // Russkij medicinskij zhurnal. – 2001. – T. 9. – № 5. – S. 1–11.
2. Aver'janov A. V. Antibakterial'naja terapija vnebol'nichnoj pnevmonii tjazhelogo techenija / A. V. Aver'janov // Uchastkovyj terapevt. – 2008. – №4 – S. 2–3.
3. Vnebol'nichnaja pnevmonija u vzroslyh: prakticheskie rekomendacii po diagnostike, lecheniju i profilaktike. Posobie dlja vrachej / A. G. Chuchalin, A. I. Sinopal'nikov, R. S. Kozlov. – Moskva, 2010. – 146 s.
4. Gemeljuk I. Ju. Kliniko-immunologicheskie osobennosti i antibakterial'naja himioterapija pnevmonij pri vtorichnyh immunodeficitnyh sostojanijah : avtoref. ...kand. med. n. – Samara, 2005. – 19 s.
5. Ivanchik N. V. Jetiologija fatal'nyh vnebol'nichnyh pnevmonij u vzroslyh / N. V. Ivanchik, S. N. Kozlov, S. A. Rachina // Pul'monologija. – 2008. – № 6. – S. 53–58.
6. Lapach S. N. Statisticheskie metody v mediko-biologicheskij issledovanijah s ispol'zovanijem Exel / S. N. Lapach, A. V. Gubenko, P. N. Babich. – K. : Morion, 2000. – 320 s. – ISBN 966-7632-16-4. MediaSfera, 2002. – 312 s.
7. Nejko E. M. Dejaki imunologichni kriterii zvizhajnogo ta zatzajznogo perebigu pnevmonij / E. M. Nejko, M. M. Ostrovskij // Ukraïns'kij pul'monologichnij zhurnal – 2002. – № 2. – S. 32–34.
8. Novikov Ju. K. Gramotricatel'nye pnevmonii / Ju. K. Novikov // Russkij medicinskij zhurnal. – 2004. – № 2. – S. 7–9.
9. Nud'ga A. N. Tjzhelye pnevmonii s fatal'nym ishodom (analiz techenija, osobennosti) / A. N. Nud'ga, E. A. Koval'eva, V. A. Galinskaja // Medicina neotlozhnyh sostojanij. – 2006. – №5(6). – S. 10–16.

10. Osobennosti techenija, diagnostiki i lechenija pnevmonii pri nalichii modificirujushhix faktorov : prakticheskoe posobie / T. A. Perceva [i dr.]. – Kiev, 2012. – 69 s.
11. Pnevmoctoz – aktual'naja immunodeficit-associirovannaja infekcija (jepidemiologija, klinika, diagnostika i lechenie) : metodicheskoe posobie / N. V. Karazhas, T. N. Rybalkina, M. N. Kornienko. – Moskva, 2010. – 51 s.
12. Pro zatverdzhennja klinichnih protokoliv nadannja medicinoj dopomogi za special'nistju «Pul'monologija» : Nakaz MOZ Ukraini № 128 vid 19.03.2007 r. – Kiiv, 2007. – 146 s.
13. Rebrova O. Ju. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnih programm STATISTICA / O. Ju. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2002. – 312 s.
14. Sinopal'nikov A. I. Novye rekomendacii po vedeniju vzroslyh pacientov s vnebol'nicnoj pnevmoniej: diagnostika, ocenka stepeni tjazhesti, antibakterial'naja terapija, profilaktika (Po materialam rekomendacij Amerikanskogo torakalnogo obshhestva, 2001 g.) / A. I. Sinopal'nikov, L. S. Strachunskij, O. V. Sivaja // Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija. – 2001. – T.3. – № 4. – S. 355–370.
15. Feshhenko Ju. I. Negospital'na pnevmonija u doroslih osib: etiologija, patogeneza, klasifikacija, diagnostika, antibakterial'na terapija (proekt klinichnih nastanov) / Ju. I. Feshhenko, O. A. Golubovs'ka, K. A. Goncharov // Ukrain'skij pul'monologichnij zhurnal. – 2012. – № 4. – 132 s.
16. Jakovlev S. V. Tjazhelaja vnebol'nicnaja pnevmonija. V kn.: Pnevmonija : Pod red. A. G. Chuchalina, A. I. Sinopal'nikova, N. E. Chemehovskoj. – Moskva, 2002. – 266 s.
17. American Thoracic Society. Guidelines for the initial management of adults with community-acquired pneumonia: Diagnosis, assessment of severity, and initial antimicrobial therapy // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2001. – Vol. 163. – P. 1730–1754.
18. An emergency department based randomized trial of nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage for early pathogen identification in severe community-acquired pneumonia / R. Rodriguez [et al.] // The Journal of Emergency Medicine. – 2001. – Vol. 38. – P. 357–363.
19. Cohen J. HIV Infections and AIDS Deaths Dropping, But Epidemic Still Daunting / J. Cohen // Science Insiderer. – 2012. – Vol.5. – P. 12–15.
20. El-Solh A. A. Etiology of severe pneumonia in the very elderly / A. A. El-Solh, P. Sikka, F. Ramadan // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2001. – Vol. 163. – P. 645–651.
21. Luna C. M. Community-acquired pneumonia: etiology, epidemiology, and outcome in teaching hospital in Argentina / C. M. Luna, A. Famiglietti, R. Absi // Chest. – 2000. – Vol. 118. – P. 1344–1354.
22. Pozzetto B. Multiplex PCR theranostics of severe respiratory infections / B. Pozzetto // Expert Review of Anti-infective Therapy. – 2010. – Vol. 8(3). – P. 251–253.

*Матеріал надійшов до редакції 05.05.2014 р.*