

М.А. Харитонов, В.В. Иванов, М.А. Журкин,
В.В. Данцев, В.П. Кицышин, Р.Р. Садыков,
С.Д. Жоголев, К.Д. Жоголев,
С.Л. Гришаев, И.В. Миронов

Роль современных методик этиологической диагностики в изучении структуры возбудителей внебольничной пневмонии у военнослужащих

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. Внебольничная пневмония относится к наиболее распространенным заболеваниям органов дыхания, что обусловлено частым поражением респираторного тракта различными инфекционными агентами и постоянно меняющейся микробной флорой, возрастанием резистентности бактерий к антибактериальным препаратам. Рассматриваются доступные современные методики этиологической диагностики внебольничной пневмонии: иммунохроматографические экспресс-методики, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция. Показано, что стандартный бактериальный посев мокроты не всегда позволяет своевременно и полноценно определить инфекционных агентов внебольничной пневмонии. В настоящее время имеется возможность применения дополнительных методов и методик этиологической диагностики. Использование полимеразной цепной реакции мокроты и иммуноферментного анализа крови позволяют выявлять возбудителя в течение 3 суток, а иммунохроматографические экспресс-системы дают возможность определить в мокроте вирусные агенты через 15 мин после взятия материала у госпитализированного больного, что позволяет сразу назначить адресную этиотропную терапию. Однако использование иммунохроматографических экспресс-методик для диагностики вирусов у больных с внебольничной пневмонией свидетельствует об их недостаточной эффективности (в среднем в 2–4 раза) по сравнению с результатами иммуноферментного анализа крови. При этом в определенных случаях экспресс-системы позволяют в течение нескольких минут верифицировать вирусный агент в мокроте и назначить раннее таргетное противовирусное лечение. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности применения полимеразной цепной реакции мокроты и иммуноферментного анализа крови в качестве дополнительных современных методик обнаружения возбудителей внебольничной пневмонии.

Ключевые слова: пульмонология, тяжелая внебольничная пневмония, военнослужащие, иммунохроматографические экспресс-методика, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, бактериологический посев мокроты, вирусы.

Введение. Внебольничная пневмония (ВП) – входит в число наиболее распространенных заболеваний органов дыхания человека, в последние годы увеличивается количество случаев внебольничной пневмонии тяжелого течения. Летальность от ВП среди лиц молодого и среднего возраста без сопутствующих заболеваний сохраняется на уровне от 1 до 5% с тенденцией к росту в последние годы на фоне эпидемий гриппа, включая вирус H₁N₁ [14, 15].

В современных условиях заболевания органов дыхания являются одной из самых актуальных проблем медицинской службы Министерства обороны Российской Федерации (МО РФ). К данной патологии относятся: грипп, острые респираторные заболевания (ОРЗ), острый бронхит (ОБ), ВП [10, 13, 15].

Колебания заболеваемости острыми респираторно-вирусными инфекциями, бронхитами и пневмониями связаны с сезонными и климатическими факторами, периодами и особенностями воинской службы (адаптация новобранцев, военно-профессиональные и экологические воздействия и др.) [1, 6, 9].

Несмотря на современные методы диагностики и постоянное совершенствование антибактериальных средств, ВП по-прежнему занимает 4-е место в структуре причин смерти в РФ после сердечно-сосудистой патологии, онкологических заболеваний, цереброваскулярной патологии и хронических обструктивных заболеваний легких, а среди инфекционных болезней – 1-е место [3–5].

Смертность от ВП сохраняется практически неизменной на протяжении последних десятилетий и составляет 30–50 на 100000 населения, а летальность среди госпитализированных лиц составляет 4–30%, в зависимости от возраста и наличия у больных сопутствующих заболеваний [13].

Наименьшая летальность от ВП у лиц молодого и среднего возраста без сопутствующих заболеваний (1–3%). У больных в возрасте старше 60 лет с наличием сопутствующей патологией (онкология, сахарный диабет, алкоголизм и др.) она достигает 15–30%, а при ВП, осложненной сепсисом, – 50% и выше [15]. В Соединенных Штатах Америки (США)

летальность при ВП у лиц до 60 лет составляет 1–5% [16, 17].

Наряду с пневмококком, чаще всего вызывающим ВП, могут быть выделены и другие возбудители, в том числе легионеллы, микоплазмы, хламидии и другие атипичные возбудители. Сложность ситуации состоит в том, что антибактериальная терапия пневмококковой пневмонии и пневмонии, вызванной атипичными возбудителями, коренным образом отличается.

В организованных коллективах в последние годы к возникновению пневмоний тяжелого течения приводят эпидемические вспышки заболеваний верхних и нижних дыхательных путей, вызванные различными вирусами [9].

Для успешного лечения ВП существенное значение имеет ранняя этиологическая диагностика как бактериальных, так и вирусных агентов. В РФ возможности микробиологической диагностики пневмоний до недавнего времени отставали от требований времени, что затрудняло своевременное назначение адекватной антибактериальной терапии в соответствии с рекомендациями по лечению пневмоний, разработанными экспертами Российского респираторного общества, и в соответствии с международными стандартами [15].

Обычный бактериологический посев занимает от 3 до 7 суток в зависимости от вида выделяемого микроорганизма. В этих условиях на первый план выходит проблема длительного ожидания результатов лабораторных исследований. В случае тяжелой пневмонии времени для «адресного» выбора антибиотика может и не быть. Кроме того, в большинстве случаев культуральный метод не позволяет идентифицировать истинных возбудителей, а выявляет условно патогенную флору.

Особое значение приобретает микробиологическая диагностика пневмококковой и легионеллезной инфекции, поскольку клинически отличить тяжёлые пневмонии, вызванные данными возбудителями, практически невозможно. Среди некультуральных методик диагностики тяжелой пневмонии наибольшее распространение в последние годы получила иммунохроматографическая методика, предусматривающая выявление пневмококкового и легионеллезного клеточного полисахаридного антигена в моче. Ее основное преимущество – возможность использования «у постели больного» в связи с простотой выполнения и быстрым получением результата [12, 15]. Таким образом, с помощью экспресс-методик можно быстро и надёжно установить диагноз по анализу мочи больного [11], причем уже на уровне первичного звена здравоохранения [7, 8].

В настоящее время Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует также использовать экспресс-методики для первичного скрининга ОРЗ, особенно в начале периода повышения заболеваемости и при возникновении эпидемии [11].

В вестнике ВОЗ за май 2009 г. приведены данные об успешном использовании экспресс-методик во время вспышки заболевания новым вирусом гриппа А (H1N1) среди школьников в Кобе, Япония [11].

Точное и своевременное выявление инфекционного агента позволяет правильно оценить эпидемическую обстановку в регионе, корректно назначить лечение в каждом случае заболевания и своевременно принять необходимые санитарно-эпидемиологические меры.

При выборе экспресс-методик в первую очередь следует учитывать характеристики достоверности и надёжности. Методика «BinaxNOW Influenza A&B» (проба на грипп А и В) производится в США, широко используется во многих странах мира и имеет репутацию высококачественной, достоверной, надёжной и простой в использовании средства диагностики. Данная методика выявляет все известные субтипы вируса гриппа типа А, в том числе штамм H1N1, вызывающий «свиной грипп», что подтверждено лабораторными исследованиями. Для постановки анализа используются образцы носоглоточного или назального мазка или назального смыва/аспирата. Методики «Binax» позволяют выдавать результат пациенту непосредственно во время первичного визита к врачу или первого посещения лаборатории, что является основополагающим для постановки диагноза и своевременного назначения лечения [11].

Клинические показатели качества экспресс-методик были получены в мультицентровых клинических испытаниях, проведенных как на территории США так и за ее пределами во время сезона респираторных заболеваний 2004, 2005 и 2006 года. Дополнительные испытания были проведены на ретроспективных замороженных клинических образцах, забранных у симптоматических пациентов из кабинетов терапевтов, приемных клиник и больниц, расположенных на юге, северо-востоке и на среднем западе США, и одной больницы в Швеции [11].

Экспресс-методики «BinaxNOW Influenza A&B» (пробы на грипп А и В) зарегистрированы в РФ. Однако большого опыта их применения в РФ нет, что требует дальнейшего изучения данного вида диагностики.

Современные методика этиологической диагностики острых вирусных инфекций дыхательных путей основаны прежде всего: на выявлении рибонуклеиновой/дезоксирибонуклеиновой кислот (РНК/ДНК) возбудителей методами амплификации нуклеиновых кислот, в частности, с помощью наиболее широко используемой полимеразной цепной реакции (ПЦР); на обнаружении антигенов с помощью иммунохроматографии (ИХГ), иммуноферментного анализа (ИФА), иммунофлюоресценции.

Некоторое значение, в основном для ретроспективной диагностики возбудителя, сохраняют методика по обнаружению специфических антител в сыворотке крови: реакция связывания комплемента, реакция нейтрализации, реакция торможения гемагглютинации, реакция непрямой гемагглютинации, ИФА [15].

Достоверным доказательством первично вирусной пневмонии (или смешанной вирусно-бактериальной

пневмонии), согласно международным критериям, служит обнаружение нуклеиновых кислот вируса гриппа или другого респираторного вируса методом ПЦР. Чаще для диагностики используются мазки из носоглотки и с задней стенки глотки, при этом наибольшей чувствительности вследствие большего содержания вирусов в исследуемом образце удается добиться при комбинации мазков из обоих локусов.

Цель исследования. Изучить современную этиологическую структуру возбудителей ВП у лиц молодого возраста в условиях организованных воинских коллективов и провести сравнительную оценку информативности различных методик этиологической диагностики ВП.

Материалы и методы. Обследовано 108 военнослужащих, страдающих ВП, проходивших стационарное лечение в клиниках Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова и 442-го окружного военного госпиталя в период с октября 2013 по май 2015 г. В исследование включались только лица мужского пола в возрасте 18–25 лет, проживающие в условиях организованных коллективов (казарма), без сопутствующих хронических заболеваний.

Все больные были разделены на две группы в зависимости от степени тяжести ВП: 39 человек с тяжелой ВП (ТВП) и 69 – с нетяжелой ВП (НВП).

Течение ВП расценивалось как тяжелое по следующим признакам: склонность к гипотонии, частота сердечных сокращений более 125 уд/мин, прогрессивное нарастание одышки, частота дыхательных движений более 25 в 1 мин, нарушения сознания, рентгенологическая картина мультилобарного или двустороннего поражения легочной ткани, нарушения кислотно-основного состояния и газов крови, наличие осложнений (острая дыхательная недостаточность, инфекционно-токсический миокардит, инфекционно-токсический шок, острый респираторный дистресс-синдром, экссудативный плеврит) [2].

Всем больным при поступлении проводилась ИХГ мокроты для обнаружения вирусных агентов: аденовирусов, респираторно-синцитиального вируса (РСВ), вирусов гриппа А и В.

Для экспресс-диагностики аденовирусной инфекции в мазках из зева, соскобах со слизистой носоглотки, носоглоточных аспиратах и назальных смывах использовалась АденоСтик (респираторный) – ИХГ диагностическая система. Для выявления вирусов гриппа А и В использовалась методика «BinaxNOW® Influenza A&B» (грипп А и В), а для выявления РСВ – методика «Binax NOW®RSV». Эти диагностические системы предназначены для качественного определения нуклеопротеиновых антигенов гриппа А и В, РСВ in vitro в образцах носоглоточного и назального мазков, назального смыва/асpirата.

В первые двое суток от момента поступления в клинику всем пациентам проводилось бактериологическое исследование мокроты с определением чувствительности к антибактериальным препаратам,

исследование мокроты методом ПЦР для определения бактериальной микрофлоры, а для выявления вирусов проводился ИФА крови.

Для бактериологического посева мокроту собирали утром натощак в стерильный контейнер во время приступа кашля со слизью. Перед забором пациенты чистили зубы и полоскали рот кипяченой водой.

Для проведения ПЦР использовались следующие приборы:

1. Прибор для детекции в режиме реального времени – детектирующий амплификатор ДТ-322 Общество с ограниченной ответственностью (ООО) «ДНК-Технологии» (Москва).

2. Приборы для детекции методом Flash и методом электрофореза: многоканальный амплификатор «Терцик» ООО «ДНК-Технологии» (Москва), флуоресцентный ПЦР-детектор «Джин-4» ООО «ДНК-Технологии» (Москва), система для гель-электрофореза. Каждый прибор использовался для целенаправленного определения того или иного возбудителя в мокроте пациентов.

Для проведения ИФА использовался иммуноферментный планшетный анализатор «StatFax 4300 Chromate» (США).

Результаты и их обсуждение. У больных с нетяжелой внебольничной пневмонией (НВП) в 33% случаев в посевах мокроты не удалось выявить возбудителя, в 56% случаев выявлен условно-патогенный возбудитель – *S. viridians*, а классический – *S. pneumoniae* – только у 10%. Следовательно, стандартный посев мокроты является низкоинформативным и слабо чувствительным в диагностике этиологических агентов НВП.

Использование ПЦР мокроты позволило выявить *S. pneumoniae* уже у 43% больных НВП, *H. influenzae* и *M. pneumoniae* – в 26% (13 и 13% соответственно), *S. aureus* – в 6%. Не идентифицированы бактерии в мокроте у 23% больных.

Данные ИФА крови показали, что в 35% случаев у больных имело место сочетанное вирусное и бактериальное поражение органов дыхания, из них у 20% больных выявлены аденовирусы, у 10% – РСВ, в 5% случаев были выявлены спорадические случаи инфицирования вирусом гриппа А (H1N1), в 3% случаев – смешанная вирусная этиология. Не обнаружены вирусные агенты у 65% пациентов с НВП.

Выявлено, что ПЦР и ИФА по сравнению с бактериологическим посевом мокроты обладают большей информативностью. Так, процент выявления *S. pneumoniae* у больных, страдающих НВП вырос более, чем в 4 раза (43% против 10%), при этом обнаружены другие нераспознанные грозные патогены, включая атипичную флору (*M. pneumoniae*).

Несмотря на яркую клиническую и лабораторную картину ТВП, в 40% случаев посевом мокроты не удалось обнаружить возбудитель. Условно-патогенная флора высевалась в 30%, на долю *S. pneumoniae* приходилось 20%, *Kl. pneumoniae* была выявлена в 10%

случаев. Прочие бактерии (*S. aureus*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, *A. baumannii*) высевались менее чем в 1% случаев.

Полученные данные свидетельствуют, что посев мокроты зачастую неинформативен и не позволяет найти патогенную флору, что может быть связано с трудностями сбора и обработки исследуемого материала. По-прежнему в мокроте больных ВП высевается высокая доля условно-патогенных микроорганизмов, что мешает установить истинного возбудителя.

Используя ПЦР исследования мокроты у 75% больных ТВП были верифицированы следующие микроорганизмы: *S. pneumoniae* – 10%, *H. influenzae* – 5%, *M. pneumoniae* – 20%, *Kl. pneumoniae* – 25%, *S. aureus* – 5%, *A. baumannii* – 10%, в 25% случаев не удалось определить возбудитель. ИФА позволил выявить аденовирусную инфекцию у 60% больных, вирус гриппа подтип А у – 30%. При этом в 10% случаев наблюдалось сочетание 2–3 вирусов.

Таким образом, ПЦР по сравнению с бактериологическим посевом мокроты обладает более высокими диагностическими возможностями и позволяет идентифицировать как классические возбудители ВП, так и ряд атипичных и нозокомиальных микроорганизмов, обладающих высокой резистентностью к антимикробным препаратам (АМП). Это позволило выбрать таргетную антибактериальную терапию. ИФА крови также продемонстрировал существенную роль в обнаружении вирусной инфекции в современной этиологии ВП и позволил назначить адекватную противовирусную терапию в зависимости от выявленного вируса.

Применение экспресс-методик для раннего выявления вирусных агентов в мокроте у больных с ВП до получения результатов ИФА крови позволяет обнаружить аденовирусы в 5% случаев при НВП и в 30% – при ТВП, РСВ был верифицирован в 3 и 5% случаев соответственно. Вирус гриппа А у больных с НВП определялся лишь у 2%, а вирус гриппа В – у 0,5%. У пациентов с ТВП грипп А выявлен в 20% случаев, а грипп В – в 3%. При этом сочетание 2–3 вирусов было установлено лишь у 1% больных с НВП и 4% – с ТВП.

Вместе с тем ИФА крови позволил выявить аденовирусную инфекцию у больных с НВП у 20% военнослужащих против 5% – по данным ИХГ. У больных с ТВП аденовирусы были выявлены в 60% случаев, а при ИХГ – только в 30%. Существенные различия были установлены и по другим вирусным агентам. Так, вирус гриппа А у 5% больных, страдающих НВП и у 30% – ТВП определялся при использовании ИФА, а при экспресс-методиках – у 2 и 20% соответственно. В итоге получены данные, свидетельствующие о более низкой чувствительности и специфичности современных ИХГ-систем. Однако, несмотря на это, данные экспресс-методики для определения вирусов являются простыми, понятными и доступными для всех категорий медицинского персонала и позволяют провести диагностику в кратчайшие сроки уже на этапе поступления больного в прием-

ное отделение, до того как будут готовы результаты других более эффективных методов верификации вирусных агентов.

Выводы

1. Стандартный бактериальный посев мокроты не позволяет получить своевременную и полноценную этиологическую расшифровку значимых возбудителей ВП.

2. Использование ПЦР мокроты и ИФА крови позволяют выявлять возбудителя в течение 3 суток, а ИХТ мокроты дает возможность определить вирусные агенты за 15 мин после взятия материала у госпитализированного больного, что позволяет сразу назначить адресную этиотропную терапию.

3. Применение иммунохроматографических экспресс-методик для диагностики этиологических вирусных агентов у больных с ВП свидетельствует об их более низкой специфичности и чувствительности (в среднем в 2–4 раза) по сравнению с результатами ИФА крови, однако в определенных случаях позволяют очень оперативно обнаружить ключевые вирусные патогены с назначением таргетных противовирусных средств.

Литература

1. Жданов, К.В. Профилактика, диагностика и лечение острых респираторных заболеваний и гриппа К.В. Жданов [и др.] // Указания по диагностике, лечению и профилактике ВС РФ. – М.: МО РФ ГВМУ, 2013. – 64 с.
2. Зайцев, А.А. Применение шкал оценки тяжести состояния больных внебольничной пневмонией у пациентов молодого возраста / А.А. Зайцев, Ю.В. Овчинников, С.В. Чернов // Воен.-мед. журн. – 2014. – Т. 24. – С. 31–34.
3. Казанцев, В.А. Пневмонии: Современный подход к диагностике и лечению / В.А. Казанцев // Этиотропная терапия и лабораторная диагностика в амбулаторной и госпитальной практике: мат. конф. – СПб.: ВМА, 2007. – С. 32–37.
4. Казанцев, В.А. Противовоспалительная терапия при внебольничной пневмонии / В.А. Казанцев // Пульмонология. – 2010. – № 5. – С. 33–37.
5. Кучмин, А.Н. Диагностика, лечение и профилактика внебольничной пневмонии у военнослужащих МО РФ: метод. указания / А.Н. Кучмин, В.Г. Акимкин, А.И. Синопальников. – М.: ГВКГ им. Н.Н. Бурденко, 2010. – 66 с.
6. Лобзин, Ю.В. Руководство по инфекционным болезням / Ю.В. Лобзин. – СПб.: ООО «Изд-во Фолиант», – 2011. кн. 2. – 744 с.
7. Приказ Минздравсоцразвития России от 04.09.2006 № 630 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным с пневмонией». – Росс. газета. – 2006. – 6 сентября.
8. Приказ Министра здравоохранения Российской Федерации от 15 ноября 2012 г. № 916н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи населению по профилю «пульмонология». – Росс. газета. – 2012. – 18 ноября.
9. Диагностика, лечение и профилактика внебольничных пневмоний тяжелого течения у военнослужащих / Н.Н. Рыжман [и др.] // Методические рекомендации. – СПб.: ВМА, 2014. – 60 с.
10. Синопальников, А.И. Внебольничные инфекции дыхательных путей: диагностика и лечение. Руководство для врачей / А.И. Синопальников, Р.С. Козлов. – М.: М-Вести, 2008. – 272с.
11. Тартаковский, И.С. Новые возможности микробиологической диагностики пневмоний / И.С. Тартаковский // Современные подходы к диагностике атипичных пневмоний (SARS): мат. конф. – М., 2009. – С. 22–23.

12. Харитонов, М.А. Пневмонии / М.А. Харитонов, В.А. Андреев, Т.И. Оболенская // Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы: руководство для врачей. – М.: ГОЭТАР-медиа, 2014. – С. 430–458.
13. Чучалин, А.Г. Пульмонология: национальное руководство / А.Г. Чучалин. – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2009. – 957 с.
14. Чучалин, А.Г. Тяжелые формы гриппа: диагностические и лечебные алгоритмы / Пульмонология. – 2009. – № 5. – С. 5–7.
15. Чучалин, А.Г. Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых / А.Г. Чучалин [и др.]. – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2014. – 91 с.
16. Chalmers, J.D. Severity assessment tools for predicting mortality in hospitalised patients with community-acquired pneumonia / J.D. Chalmers [et al.] // Thorax. – 2010. – P. 213–216.
17. Williams, K.M. Rapid Diagnostic Testing for URIs in Children: Impact on Physician Decision Making and Cost. / K.M. Williams [et al.] // Infect. Med. – 2002. – № 19 (3). – P. 109–111.

M. A. Kharitonov, V.V. Ivanov, M.A. Zhurkin, V.V. Dantsev, V.P. Kitsyshin,
R.R. Sadykov, S.D. Zhogolev, K.D. Zhogolev, S.L. Grishayev, I.V. Mironov

Role of modern methodics of etiological diagnostics in study of structure of community acquired pneumonia causative agents in soldiers

Abstract. *Community acquired pneumonia is one of the most common respiratory diseases due to the fact that respiratory tract is often affected by different infectious agents and by constantly changing microbial flora, and to the increasing resistance of bacteria to antibacterial drugs. Available modern methods and techniques of etiological diagnostics of community-acquired pneumonia are covered in this article: immunochromatography express-tests, immunoenzyme assay and polymerase chain reaction. It is shown that standard bacteriological sputum culture does not always allow us to reveal infectious agents of community-acquired pneumonia timely and precisely. At present, it is possible to use additional methods and techniques of etiological diagnostics. The use of polymerase chain reaction of sputum and immune-enzyme assay of blood allows us to reveal the infectious agent in 3-days' time, while immunochromatography express-tests can show viruses in sputum 15 minutes after taking the sample material from the hospitalized patient, which allows us to administer target etiotropic therapy at once. However, the use of immunochromatography express-tests for diagnosing viruses in patients with community-acquired pneumonia proves to be insufficiently effective as compared to the results of immunoenzyme assay of blood (on average 2 to 4 times less effective). But in some cases express-systems can verify the infectious agent in sputum in several minutes, which enables us to administer early target antiviral therapy. The obtained results show the effectiveness of the use of polymerase chain reaction of sputum and immune-enzyme assay of blood as additional modern methods of revealing causative agents of community-acquired pneumonia.*

Key words: *pulmonology, severe community-acquired pneumonia, soldiers, immunochromatography express-tests, immune-enzyme assay, polymerase chain reaction, bacteriological sputum culture, viruses.*

Контактный телефон: 8-903-096-15-01; e-mail: Sea-89@yandex.ru