Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Выявление редких труднокультивируемых форм возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания с использованием метода ПЦР

Методические рекомендации
МР 4.2.0060—12

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.9
В92
В92 **Выявление** редких труднокультивируемых форм возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания с использованием метода ПЦР: Методические рекомендации.— М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—15 с.

1. Разработаны Федеральным бюджетным учреждением науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И. Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Е. И. Ефимов, В. Н. Мазепа, Н. Ф. Бруснигина, О. М. Черневская, К. А. Орлова, М. А. Махова, Е. В. Сперанская, Н. Н. Кленина, Л. Е. Скобло).

Разработаны в рамках реализации отраслевой научно-исследовательской программы «Научные аспекты обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в Российской Федерации на 2006—2010 гг.».

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 9 апреля 2012 г.

3. Введены в действие с момента утверждения.

ББК 51.9

© **Роспотребнадзор, 2012**
© **Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012**

Содержание

Термины и сокращения 3
Введение 4
1. Область применения 6
2. Нормативные ссылки 6
3. Сущность метода 7
4. Требования к помещениям и технике безопасности 7
5. Аппаратура, материалы и реактивы 7
6. Подготовка материала для исследований 8
7. Порядок проведения исследования 9
7.1. Выделение ДНК из клинического материала 9
7.2. Амплификация ДНК (ПЦР) 9
7.3. Выявление продукта ПЦР 10
8. Интерпретация результатов 10
9. Эффективность использования метода 11
Список использованной литературы 14

Термины и сокращения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ПЦР – полимеразная цепная реакция
УФ-свет – ультрафиолетовый свет

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
9 апреля 2012 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Выявление редких труднокультивируемых форм возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания с использованием метода ПЦР

Методические рекомендации
МР 4.2.0060—12

Введение

Воспалительные заболевания органов дыхания инфекционно-аллергической природы (бронхиты, пневмонии, бронхиальная астма) – одна из актуальных проблем современного здравоохранения. Они являются причиной большинства госпитализаций, на них приходится большое количество смертельных исходов. [1, 2, 3].

В настоящее время все большее значение в развитии заболеваний респираторного тракта придается так называемым «атипичным» патогенам – *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, которые специфически взаимодействуют с эпителиальными клетками дыхательных путей, нарушая мукоцилиарный клиренс, оказывают иммуносупрессивное действие [4, 5, 6]. Кроме того, они устойчивы к бета-лактамным антибиотикам, наиболее часто применяемым в клинической практике. Все эти свойства позволяют им не только длительно сохраняться в организме в виде моноинфекции, но и способствуют формированию смешанной (бактериальной-бактериальной, бактериальной-вирусной) инфекции, поддерживающей постоянный воспалительный процесс на слизистых респираторного тракта.

Несмотря на то, что частота обнаружения *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Cytomegalovirus* существенно ниже *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, выявление их при диагностике заболеваний органов дыхания крайне важно, так как при их обнаружении проводится специфическое, отличающееся от традиционного, лечение.

При проведении лабораторных исследований, как правило, используют комплекс методов – бактериологических, культуральных, иммунологических, серологических [7, 8, 9]. Большинство атипичных возбудителей, которые характеризуются высокой антигенной изменчивостью, данными методами детектируются недостаточно успешно.

При этиологической диагностике инфекционных заболеваний органов дыхания в большинстве исследований (до 90 %) не выявляется инфекционный агент. В связи с этим разработка эффективных и экономически целесообразных способов детекции этих инфекционных агентов приобретает особую актуальность.

В настоящих методических рекомендациях предлагается проводить обнаружение редких форм возбудителей методом ПЦР в пуле ДНК, выделенной из смеси субстратов (мокроты, мазков со слизистой задней стенки глотки и бронхоальвеолярной жидкости) от пяти пациентов, что сокращает материальные затраты, снижает себестоимость исследования, повышает эффективность выявления инфекционных агентов.

Предложенный алгоритм исследования позволяет провести обследование больных с острыми и хроническими заболеваниями органов дыхания одновременно на большинство редких труднокультивируемых инфекционных агентов современными молекулярно-генетическими методами. В настоящее время в отечественной медицинской практике подобные исследования не регламентированы соответствующими документами, зачастую они проводятся в недостаточном объеме.

В странах Европы и США метод ПЦР широко используется для выявления вирусных и бактериальных возбудителей заболеваний респираторного тракта, что увеличивает эффективность определения этиологического агента [10, 11, 12].

Исследование пула смеси субстратов одновременно на комплекс инфекционных агентов снижает себестоимость анализа в 3—4 раза и увеличивает вероятность выявления возбудителя. Таким образом, предложенный алгоритм дает возможность проводить экономически оправданный скрининг и мониторинг больных с разными типами патологии респираторного тракта на наличие редких, труднокультивируемых форм возбудителей.

1. Область применения

1.1. Настоящие медицинские рекомендации (далее – МР) применяют при проведении исследований с целью выявления этиологических агентов, вызывающих воспалительные и инфекционно-аллергические заболевания органов дыхания.

1.2. В настоящих МР представлен первичный (скрининговый) способ выявления труднокультивируемых и редко встречающихся бактериальных и вирусных возбудителей заболеваний органов дыхания у детей и взрослых. Определен перечень редких микроорганизмов, способных вызывать целый ряд инфекционных заболеваний верхних и нижних дыхательных путей. Разработан оптимизированный алгоритм детекции этих возбудителей с использованием метода ПЦР-минипулов, позволяющий снизить себестоимость исследования в 3—4 раза.

1.3. Методические рекомендации предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также для инфекционистов, аллергологов, пульмонологов, терапевтов, педиатров медицинских организаций Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

2. Нормативные ссылки

1. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней».

2. СП 1.3.2518—09 «Дополнения и изменения 1 к СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней».

3. СанПиН 2.1.7.2527—09 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

4. МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

5. МУ 4.2.2039—05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

6. МУ 3.5.5.1034—01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп при работе методом ПЦР».

3. Сущность метода

Сущность предлагаемого метода заключается в том, что с целью повышения эффективности выявления инфекционных агентов и снижения себестоимости исследования для ПЦР-детекции редких видов возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания формируют минипул из ДНК, выделенной из смеси субстратов (мокроты, бронхоальвеолярного лаважа, мазка со слизистой задней стенки глотки) от пяти (четырех, трех) человек.

4. Требования к помещениям и технике безопасности

4.1. Планировка помещений лаборатории и организация работы по проведению ПЦР-исследований осуществляются в соответствии с МУ 1.3.2569—09.

4.2. Для работы с возбудителями респираторных заболеваний, которые относятся к III—IV группам патогенности, оформляется лицензия на право работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности.

4.3. При контакте с исследуемым материалом необходимо соблюдать меры предосторожности, изложенные в СП 1.3.2322—08, СП 1.3.2518—09.

4.4. Утилизацию исходных субстратов и отходов ПЦР-исследования проводят в соответствии с СанПиН 2.1.7.2527—09, МУ 3.5.5.1034—01, МУ 1.3.2569—09.

5. Аппаратура, материалы и реактивы

5.1. Оборудование, необходимое для проведения исследования

Стандартное оборудование для ПЦР-лаборатории отечественного и зарубежного производства, имеющее номера Государственной регистрации в Российской Федерации [13].

5.2. Наборы реагентов для обработки клинического материала

Комплекты реагентов отечественного производства для выделения ДНК из крови, ликвора, мокроты, биоптатов и др., основанные на лизисе клеток детергентами и сорбции нуклеиновых кислот типа «ДНК-Сорб В» (или эквивалент) и «Проба ГС» (или эквивалент), имеющие номера Государственной регистрации в Российской Федерации.

5.3. Наборы реагентов для постановки ПЦР

ПЦР-тест-системы отечественного производства типа «АмплиСенс» (или эквивалент) и GenePak DNA PCR test, для вы-

явления *Human cytomegalovirus*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, имеющие номера Государственной регистрации в Российской Федерации.

Предпочтение отдается системам, имеющим внутренний контроль ингибирования ПЦР и систему антиконтаминационной модификации ампликонов, которые уменьшают вероятность получения ложноотрицательных и ложноположительных результатов.

5.4. Набор реагентов для проведения электрофореза в агарозе

Комплекты реагентов отечественного производства типа ЭФ-200, комплект №1 для электрофоретической детекции, содержащие агарозу для электрофореза, компоненты буфера для электрофореза, интеркалирующий агент-краситель.

5.5. Стандартные дезинфицирующие растворы

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 СП 1.3.2322—08, СП 1.3.2518—09 и МУ 3.5.5.1034—01 [14, 16].

6. Подготовка материала для исследований

При проведении анализа может использоваться следующий клинический материал: мокрота, промывные воды бронхов или бронхоальвеолярный лаваж, мазки со слизистой задней стенки глотки.

Отбор, транспортирование и хранение клинического материала проводится в соответствии с МУ 4.2.2039—05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории» (17).

Отбор материала осуществляется в процедурных кабинетах поликлиник, клинических и инфекционных стационарах.

Отбор мазков со слизистой задней стенки глотки проводят с помощью одноразовых ватных тампонов маленького размера, смоченных 0,9 %-м раствором хлорида натрия. Тампон помещают в 1,5 мл пробирку типа «Эппендорф», содержащую 200 мкл 0,9 %-го раствора хлорида натрия.

Мокроту отбирают в специальные одноразовые стерильные контейнеры с широким горлом с завинчивающейся крышкой, в количестве не более 2 мл.

Бронхоальвеолярную жидкость собирают в ходе бронхоскопии в стерильные одноразовые контейнеры в количестве не более 2 мл.

Отобранный клинический материал доставляют в тот же день в течение 3—4 ч в лабораторию.

Пробы следует хранить в холодильнике при температуре (4 ± 1) °С в течение 16 ч и/или в морозильной камере при температуре –(30 ± 1) °С в течение 2 недель. Необходимо сохранять отдельные субстраты от каждого пациента до завершения исследования.

Следует отметить, что недопустим контакт между контейнерами с субстратами разных пациентов и между контейнерами с различными субстратами от одного пациента.

7. Порядок проведения исследований

7.1. Выделение ДНК из клинического материала

Проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки клинического материала.

На первом этапе ДНК выделяют из смеси биологических субстратов от одного пациента. Исследованию подвергают смесь мокроты, мазков со слизистой задней стенки глотки и бронхоальвеолярной жидкости (лаважа). При отсутствии возможности отбора бронхоальвеолярной жидкости исследуют смесь мокроты и мазков со слизистой задней стенки глотки. Если у больного нет мокроты, анализируют смесь слюны и мазков со слизистой задней стенки глотки.

Субстраты смешивают в равных количествах таким образом, чтобы объем смеси составил 100 мкл, что является рекомендуемым объемом материала при выделении ДНК с использованием набора реагентов типа «ДНК-Сорб В» (или эквивалент).

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

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

Очищенную ДНК можно хранить в течение недели при температуре от 2 до 8 °С и в течение 1 года при температуре не выше –16 °С. Препараты ДНК, выделенные из смеси субстратов, сохраняют до завершения исследования.

7.2. Амплификация ДНК (ПЦР)

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

Для ПЦР-детекции редких видов возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания формируют минипул из ДНК, выделенной из субстратов от пяти (четырех, трех) человек. Препараты ДНК 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.

ПЦР-детекция *Cytomegalovirus*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis* проводится тест-системами типа «АмплиСенс» или GenePak DNA PCR test (или эквивалент) в соответствии с наставлениями по применению.

7.3. Выявление продукта ПЦР

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.

Для проведения электрофореза используют наборы реактивов типа ЭФ-200 или комплект № 1 для электрофоретической детекции. Электрофорез проводят в соответствии с инструкцией по применению выбранного набора.

Для учета результатов электрофореза гель помещают на трансиллюминатор. В УФ-свете видны оранжевые полосы, соответствующие фрагментам ДНК.

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

8. Интерпретация результатов

Положительными считаются образцы, содержащие полосы, идущие в геле на том же уровне, что и полоса в положительном контроле.

В случае отсутствия ДНК инфекционных агентов в минипулах исследование на этом заканчивается.

При выявлении в минипуле ДНК патогенов (как правило, одного из 5), все пробы, входящие в пул проверяются на данный(е) возбудитель(и) для установления конкретного инфицированного

пациента. ПЦР проводится так же, как изложено в п. 7.2. настоящих МР.

9. Эффективность использования метода

Оценка эффективности метода проводилась на базе лаборатории молекулярно-генетических методов надзора за инфекционными заболеваниями Нижегородского НИИЭМ им. академика И. Н. Блохиной и городских детских больниц № 1, 27, 39, Кстовской ЦРБ, Нижегородского военного госпиталя. Обследовано более 1 000 больных с различными типами патологии органов дыхания, включающими: бронхит – 347 чел., внебольничную пневмонию – 424 чел., бронхиальную астму – 180 чел., ОРЗ – 220 чел.

Результаты обнаружения труднокультивируемых форм инфекционных агентов при различных заболеваниях органов дыхания представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Частота выявления атипичных инфекционных агентов при первичном обследовании детей и взрослых с бронхолегочной патологией

Инфекционные агенты	Частота выявления, %	
	взрослые (n = 640)	дети (n = 531)
Chlamydophila psittaci	0	5,0
Chlamydophila pneumoniae	4,3	0,2
Mycoplasma pneumoniae	9,5	13,8
Legionella pneumophila	0,7	0
Cytomegalovirus	5,4	42,4
Herpes simplex I/II	11,3	6,7
Moraxella catarrhalis	2,5	0

На основании данных о частоте выявления инфекционных агентов, представленных в табл. 1 и 2, был определен спектр возбудителей, рекомендуемых для выявления методом минипулов. Спектры включают инфекционные агенты, частота выявления которых, как правило, не превышает 5 %: *Cytomegalovirus*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Mo-*

Таблица 2

Частота выявления атипичных инфекционных агентов при различных заболеваниях органов дыхания у детей и взрослых

Инфекционные агенты	Частота выявления, %					
	дети (n = 531)				взрослые (n = 640)	
	Астма	Бронхит	Пневмония	ОРЗ/ОРВИ	Пневмония	Бронхит
C. psittaci	1,6	6,3	5,7	6,3	0	0
C. pneumoniae	0	0,6	0	0	4,3	0
M. pneumoniae	10,7	10,4	23,5	10,5	12,6	6,3
L. pneumophila	0	0	0	0	0,7	0
Cytomegalovirus	39,3	53,1	31,9	45,2	4,5	6,3
H. simplex I/II	3,8	12,5	4,3	6,3	16,2	6,3
M. catarrhalis	0	0	0	0	2,5	0

raxella catarrhalis – у взрослых; *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis* – у детей.

С целью проверки чувствительности и эффективности метода минипулов были проведены сравнительные исследования 50 образцов с известным содержанием инфекционных агентов. Использовали метод ПЦР-минипулов и индивидуальное ПЦР-исследование всех образцов. Пулы были составлены таким образом, чтобы в каждом присутствовал только один образец, содержащий инфекционный агент (для получения максимального разведения). Результаты, полученные методом минипулов и индивидуальным анализом образцов, совпали в 100 % случаев. Показано, что разведение при пулировании 5 образцов не оказывает значительного влияния на эффективность выявления инфекционного агента.

Чувствительность тест систем типа «Ампли Сенс» и «GenePak DNA PCR test» составляет не менее 10^3—5×10^3 бактериальных клеток или ДНК-содержащих вирусных частиц на миллилитр клинического образца. Тест-системы высокоспецифичны, неспецифического взаимодействия праймеров не наблюдалось.

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—2,0 раза меньше времени, чем развернутый анализ отдельных субстратов на все инфекционные агенты. Анализ пула смесей от 5 пациентов дополнительно снижает себестоимость исследования в 3—4 раза. Кроме этого следует отметить, что ни один из классических методов лабораторной диагностики, кроме ПЦР, не позволяет одновременно выявлять весь спектр труднокультивируемых инфекционных агентов, на который предложено обследовать детей и взрослых. Классическими микробиологическими методами данные исследования на практике не проводятся. В связи с этим рекомендовано использовать данную медицинскую технологию для первичного обследования взрослых и детей с воспалительными заболеваниями органов дыхания на инфицированность редкими формами инфекционных агентов.

В лаборатории молекулярно-генетических методов надзора за инфекционными заболеваниями Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И. Н. Блохиной было проведено обследование 100 пациентов методом минипулов на наличие пяти инфекционных агентов: *Cytomegalovirus*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittac*i, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*. Сформировано 20 минипулов по 5 человек, у каждого из пациентов анализировалась смесь из трех субстратов.

В 13 пулах инфекционных агентов не было выявлено. В пяти пулах выявлено по 1 возбудителю (в них у одного из пяти пациентов обнаружены *Chlamydophila pneumoniae*). В двух пулах выявлено по 2 инфекционных агента (в каждом из них у одного из пяти пациентов обнаружены *Cytomegalovirus* и *Chlamydophila pneumoniae*).

Для получения этих результатов при использовании метода минипулов» потребовалось 145 ПЦР исследований. При проведении развернутого исследования всех субстратов от каждого больного на 5 инфекционных агентов потребовалось бы проведение 1 500 ПЦР исследований; при анализе смеси субстратов без пулирования – 500 ПЦР исследований. Следовательно, применение метода «двойных минипулов» позволяет снизить стоимость исследования в 3,4—10,3 раз.

Предложенный метод при использовании в комплексе с классическими клинико-лабораторными исследованиями позволяет повысить эффективность и достоверность диагностических исследований, а также создать алгоритм ведения больных воспалительными заболеваниями органов дыхания инфекционной природы.

Этиологическая диагностика воспалительных заболеваний органов дыхания с использованием предлагаемого метода позволяет своевременно проводить эффективную антибактериальную и иммуномодулирующую терапию, что сокращает сроки пребывания больного в стационаре в среднем на 1 неделю, уменьшает сроки реабилитации и снижает риск возникновения осложнений.

Список использованной литературы

1. Чучалин А. Г. Пневмония / А. Г. Чучалин, А. И. Синопальников, Л. С. Страчунский. М.: МИА. 2006. 464 с.

2. Барлет Джон Дж. Инфекции дыхательных путей. Пер. с англ. /Джон Дж. Барлет. М.: Бином. 2000. 192 с.

3. Тартаковский И. С. Современные подходы к диагностике атипичных пневмоний / И. С. Тартаковский //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. Т. 2. № 6. С. 60—68.

4. Егоров А. М. Хламидии: Молекулярная организация клетки и некоторые особенности патогенеза инфекций / А. М. Егоров, Ю. О. Сазыкин //Антибиотики и химиотерапия. 2000. Т. 45. № 4. С. 3—5.

5. Белоцерковская Ю. Г. Роль *Chlamydophila pneumoniae* в бронхолегочной патологии человека / Ю. Г. Белоцерковская, А. И. Синопальников //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2008. Т. 10. № 1. С. 15—24.

6. Синопальников А. И. Тяжелая внебольничная пневмония: этиологическая структура /А. И. Синопальников, О. В. Фесенко, Ю. Г. Тихонов, В. К. Дуганов //Антибиотики и химиотерапия. 2001. Т. 46, № 6. С. 6—11.

7. Kuroki H. Characterization of children with *Mycoplasma pneumoniae* infection detected by rapid polymerase chain reaction technique / H. Kuroki, M. Morozumi, N. Chiba, K. Ubukata // J. Infect. Chemother. 2004. V. 10. № 1. P. 65—67.

8. Фризе К. Инфекционные заболевания беременных и новорожденных / Пер. с нем. К. Фризе, В. Кахель. М.: Медицина, 2003. 424 с.

9. Чучалин А. Г. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике / А. Г. Чучалин, А. И. Синопальников, С. В. Яковлев, Л. С. Страчунский. М. 2003. 30 с.

10. Gonzales R. Uncomplicated acute bronchitis / R. Gonzales, M. A. Sande // Ann. Intern. Med. 2000. V. 133. P. 981—991.

11. Schneeberger P. M. Diagnosis of atypical pathogens in patients hospitalized with community-acquired respiratory infection /

P. M. Schneeberger, J. W. Dorigo-Zetsma, A. van der Zee et al. // Scand. J. Infect. Dis. 2004. V. 36. № 4. P. 269—273.

12. Ursi D. Detection of Mycoplasma pneumoniae in respiratory samples by real-time PCR using an inhibition control / D. Ursi, K. Dirven, K. Loens et al. // J. Microbiol. Methods. 2003. V. 55. P. 149—153.

13. МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

14. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней».

15. СанПиН 2.1.7.2527—09 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

16. МУ 3.5.5.1034—01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп при работе методом ПЦР».

17. МУ 4.2.2039—05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

gost.e-ecolog.ru