Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний

Методические указания
МУК 4.2.3115—13

Издание официальное

Москва • 2014

gost.e-ecolog.ru

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

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний

Методические указания
МУК 4.2.3115—13

ББК 51.9
Л12

Л12 **Лабораторная** диагностика внебольничных пневмоний: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014.—39 с.

ISBN 978—5—7508—1235—6

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Е. Б. Ежлова, Ю. В. Демина. Н. В. Шеенков); ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (В. В. Малеев, Г. А. Шипулин, С. Б. Яцышина); ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России (И. С. Тартаковский, И. В. Раковская, Н. А. Зигангирова, Н. В. Каражас, Л. Г. Горина); кафедрой пульмонологии РМАПО ГБОУ ВПО Минздрава России (А. И. Синопальников); НИИ антимикробной химиотерапии ГБОУ ВПО Смоленской ГМА Минздрава России (Р. С. Козлов, С. А. Рачина); ГБОУ ВПО Нижегородской ГМА Минздрава России (В. В. Шкарин, А. С. Благонравова, О. В. Ковалишина); ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (М. В. Зароченцев, И. В. Новокшонова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 1.08.2013 № 2).

3. Утверждены и введены в действие руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 21 октября 2013 г.

4. Введены в действие с момента утверждения.

5. Введены впервые.

ББК 51.9

ISBN 978—5—7508—1235—6

© Роспотребнадзор, 2014
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014

Содержание

1. Область применения 4
2. Термины и сокращения 4
3. Общие сведения о внебольничных пневмониях 5
4. Современные представления об этиологической структуре внебольничных пневмоний 6
5. Материально-техническое обеспечение лабораторных исследований 9
6. Диагностика внебольничных пневмоний. 10
6.1. Диагностика пневмококковой пневмонии 10
6.2. Диагностика других бактериальных пневмоний 13
6.3. Диагностика пневмонии, вызванной *Mycoplasma pneumoniae* 15
6.4. Диагностика пневмонии, вызванной *Chlamydophila pneumoniae* 17
6.5. Диагностика пневмонии, вызванной *Legionella pneumonia* 19
6.6. Диагностика пневмонии, вызванной *Pneumocystis jiroveci.* 21
6.7. Диагностика вирусных и вирусно-бактериальных пневмоний 23
6.8. Дифференциальная диагностика с зоонозными заболеваниями, вызывающими поражения легких, и туберкулезом 27
7. Алгоритм диагностики внебольничных пневмоний 27
8. Контроль качества лабораторных исследований 29
9. Требования безопасности 30
Приложение. Правила получения биологического материала 31
Список литературы 39

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
21 октября 2013 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний

Методические указания МУК 4.2.3115—13

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания обосновывают и определяют методические основы и алгоритмы лабораторной диагностики пневмоний при осуществлении эпидемиологического надзора в отношении внебольничных пневмоний.

1.2. Методические указания предназначены для специалистов органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы специалистами медицинских организаций и других заинтересованных организаций.

1.3. Методические указания являются обязательными при осуществлении эпидемиологического надзора в отношении внебольничных пневмоний, в ходе проведения противоэпидемических мероприятий и при эпидемиологическом расследовании возможных эпидемических вспышек внебольничных пневмоний.

2. Термины и сокращения

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения.
ВП – внебольничная пневмония.
ЛПО – лечебно-профилактическая организация.
МКБ-10 – международная классификация болезней.
ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция.

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

РИФ – реакция иммунофлюоресценция.

ИФА – иммуноферментный анализ.

ИХА – иммунохроматографический анализ.

АБТ – антибактериальная терапия.

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии.

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж.

3. Общие сведения о внебольничных пневмониях

Пневмонии – группа различных по этиологии, патогенезу, морфологической характеристике острых инфекционных заболеваний, характеризующихся очаговым поражением респираторных отделов легких с обязательным наличием внутриальвеолярной экссудации. В Международной классификации болезней, травм и причин смерти 10-го пересмотра (МКБ-10, 1992 г.) пневмонии четко обособлены от других очаговых воспалительных заболеваний легких неинфекционного происхождения. Современная классификация пневмоний учитывает прежде всего эпидемиологические условия развития заболевания, особенности инфицирования легочной ткани и состояние иммунологической реактивности организма пациента. По характеру приобретения выделяют внебольничную пневмонию (ВП) и нозокомиальную (внутрибольничную) пневмонию. В последнее время помимо термина «нозокомиальные пневмонии» используют термин более широкого значения – «пневмонии, связанные с оказанием медицинской помощи» (*healthcare-associated pneumonia*). К этой категории помимо нозокомиальных относятся пневмонии у лиц, находящихся в домах престарелых или других учреждениях длительного ухода. Следует подчеркнуть, что такое подразделение никак не связано с тяжестью течения заболевания, основным критерием разграничения являются эпидемиологические условия и окружение, при которых развилась пневмония. Однако они, как правило, отличаются от ВП по этиологической структуре возбудителей и профилем антибиотикорезистентности.

Под ВП следует понимать острое заболевание, возникшее во внебольничных условиях – то есть вне стационара или позднее 4 недель после выписки из него, или диагностированное в первые 48 ч от момента госпитализации, или развившееся у пациента, не находившегося в домах сестринского ухода/отделениях длительного медицинского наблюдения 14 или более суток, – сопровождающееся симптомами инфекции нижних отделов дыхательных путей (лихорадка, кашель, выделение

мокроты, возможно гнойной, боль в грудной клетке, одышка) и рентгенологическими признаками «свежих» очагово-инфильтративных изменений в легких при отсутствии очевидной диагностической альтернативы.

В соответствии с формой 2 государственного статистического наблюдения «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» (утвержденная приказом Росстата от 31.12.2010 № 482 «Об утверждении статистического инструментария для организации Роспотребнадзором федерального статистического наблюдения за заболеваемостью населения инфекционными и паразитарными болезнями и профилактическими прививками») в 2012 г. в Российской Федерации было зарегистрировано 493 166 случаев ВП (345,0 на 100 тыс. населения), 3 751 из которых закончились летальным исходом (0,76 % от числа зарегистрированных случаев). Из числа заболевших 65,8 % составляют взрослые, 79,0 % – представлено городскими жителями.

Современная классификация ВП, учитывающая состояние иммунологической реактивности организма пациента, позволяет выделить 2 основные группы, предполагающие различия в этиологической структуре пневмоний:

– типичная ВП (у пациентов с отсутствием выраженных нарушений иммунитета);

– ВП у пациентов с выраженными нарушениями иммунитета (синдром приобретенного иммунодефицита; прочие заболевания или патологические состояния).

4. Современные представления об этиологической структуре внебольничных пневмоний

Абсолютное значение этиологической роли того или иного возбудителя ВП можно определить лишь по отношению к конкретному региону, эпидемическому очагу или эпидемиологической ситуации. Более широкие обобщения позволяют выявить основную тенденцию, определяющую значение данного возбудителя в инфекционной патологии человека на основании соответствующего уровня стандартизации и частоты применения методов лабораторной диагностики, а также примерное соотношение ВП, вызываемых основным возбудителем пневмоний – пневмококком и другими возбудителями.

По данным отечественных и зарубежных исследователей *S. pneumoniae* является доминирующим этиологическим агентом пневмоний, вызывая от 30 до 80 % ВП у лиц всех возрастных групп (Покровский В. И. с соавт., 1995; Зубков М. Н., 2002, Cuhna B. A., 2003, Чучалин А. Г., 2006).

Среди других типичных бактериальных возбудителей пневмоний заметная этиологическая роль принадлежит *H. influenzae*, в меньшей степени представителям семейства *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и др.) , *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)* и *St. aureus*. Существенное место в этиологии ВП принадлежит группе микроорганизмов (облигатных и факультативных внутриклеточных паразитов), устойчивых к β-лактамным антибиотикам: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae* и *Legionella pneumophila*, на долю которых в сумме приходится от 8 до 25 % случаев ВП. Достоверная этиологическая диагностика ВП, вызванных данными возбудителями, возможна только при строгом соблюдении современных стандартов лабораторной диагностики (Тартаковский И. С., 2003). В противном случае высока вероятность ложноположительной диагностики для персистирующих микроорганизмов – микоплазм и хламидий и ложноотрицательной – при тяжелых пневмониях легионеллезной этиологии.

На фоне увеличения контингентов с тяжелыми дефектами иммунитета (ВИЧ-инфекция, врожденный иммунодефицит, онкогематологические заболевания и др.) за последние годы выросло этиологическое значение таких оппортунистических возбудителей ВП, как *Pneumocystis jiroveci*, цитомегаловирус. С учетом высокого уровня носительства этих возбудителей диагностику соответствующей нозологии следует осуществлять только у контингентов групп риска с использованием современных алгоритмов лабораторных исследований.

Понятие «вирусная пневмония» до настоящего времени не нашло широкого применения при постановке диагноза ВП, однако в МКБ-10 выделяют пневмонии, вызванные вирусами гриппа, парагриппа, аденовирусами и другими из группы возбудителей инфекции дыхательных путей. Вместе с тем вирусно-бактериальная этиология ВП достаточно широко известна и описана на фоне эпидемий гриппа и ОРЗ. В отечественный стандарт специализированной медицинской помощи при пневмонии тяжелой степени тяжести с осложнениями включены в качестве нозологических единиц – J10.0 «Грипп с пневмонией» (вирус гриппа идентифицирован) и J11.0 «Грипп с пневмонией» (вирус гриппа не идентифицирован).

Вирусные инфекции дыхательных путей тяжелее протекают у детей до 5 лет и пожилых людей (старше 65 лет), что отражается в высоком уровне госпитализаций по поводу пневмоний и летальности среди лиц указанного возраста. В этих возрастных группах чаще регистрируются вирусные и вирусно-бактериальные пневмонии.

Во время эпидемий гриппа риск развития пневмонии может увеличиваться для тех возрастных групп, у которых уровень анамнестических антител к циркулирующему в конкретный эпидемический сезон антигенному варианту вируса гриппа ниже защитного, как например, это наблюдалось в случае пандемического гриппа A/H1N1pdm2009 для лиц от 30 до 60 лет. К группам риска развития пневмонии при гриппе также следует относить лиц, страдающих хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой системы, нарушениями обмена веществ (ожирение, сахарный диабет), хроническими заболеваниями бронхолегочной системы, и беременных женщин.

Этиологическая структура ВП у детей существенно отличается от этиологии ВП у взрослых и варьируется в зависимости от возраста ребенка и тяжести заболевания, что должно учитываться в алгоритме диагностики пневмоний у детей. Группы риска тяжелой пневмонии составляют дети до 5 лет, часто болеющие дети и особенно рожденные на 24—28 неделе гестации.

Бактериальные возбудители пневмонии обнаруживаются у 2—50 % детей, чаще у госпитализированных детей, по сравнению с детьми, находящимися на амбулаторном лечении. Наиболее частыми бактериальными возбудителями внебольничных пневмоний у детей старше года считают *S. pneumoniae*, реже выделяют *H. Influenzae* тип b, *S. pneumoniae* является причиной одной трети пневмоний с рентгенологическим подтверждением у детей до 2 лет. В случаях тяжелого течения пневмоний, требующих интенсивной терапии, следуют предполагать инфекцию, вызванную стрептококками группы А или *S. aureus*, которые обнаруживаются в 3—7 % случаев. *Moraxella catarrhalis* обнаруживается от 1,5 до 3,0 % случаев пневмонии у детей. Смешанные вирусно-бактериальные пневмонии диагностируют у детей по разным данным в 8,2—33,0 % случаев, а при учете всех смешанных: бактериальных или вирусно-бактериальных пневмоний у детей, их частота колеблется то 8 до 40 %. Среди пневмококковых пневмоний у детей сочетание с вирусными инфекциями отмечается в 62 % случаев.

При ВП у детей необходимо учитывать возможность смешанной бактериально-вирусной инфекции, этиологическое значение хорошо известных и недавно открытых респираторных вирусов: респираторно-синцитиального, метапневмовируса, бокавируса и риновирусов. Различные вирусные возбудители респираторных инфекций обнаруживаются в 30—67 % случаев пневмонии у детей, причем их доля выше у детей младшего возраста (до 80 % случаев от 3 месяцев до 2 лет), и значительно реже встречаются у детей старше 10 лет. *M. pneumoniae* и

C. pneumoniae преимущественно вызывают пневмонии у детей школьного возраста, и не характерны для детей от 1 года до 5 лет. Данные возбудители чаще обнаруживаются во время эпидемических подъемов заболеваемости в очагах инфекции.

В эндемичных регионах и по эпидемиологическим показателям при этиологической диагностике ВП необходимо учитывать возможность возникновения зоонозных инфекций, для которых характерны воспалительные процессы в легких (лихорадка Ку, орнитоз, туляремия и др.). Важным элементом обследования больных ВП является исключение этиологической роли возбудителя туберкулеза и других микобактерий.

5. Материально-техническое обеспечение лабораторных исследований

1. Ламинарный бокс 2-го класса биологической безопасности.

2. Микроскоп бинокулярный с осветителем, набором объективов и окуляров.

3. Термостаты электрические для выращивания бактерий, поддерживающие температуру в камере в пределах (37 ± 1) °С.

4. CO_2-инкубатор, поддерживающий температуру в камере в пределах (37 ± 1) °С, содержание CO_2 на уровне 3—7 % или анаэростат.

5. Дистиллятор.

6. Автоклав электрический.

7. Холодильник, поддерживающий температуру 4—6 °С для хранения культур, биологических субстратов и реагентов.

8. Спиртовки и газовые горелки.

9. Счетчики колоний автоматические и полуавтоматические для подсчета колоний.

10. Одноразовые стерильные контейнеры для сбора и транспортирования мокроты, плевральной жидкости, трахеального аспирата, БАЛ с устойчивым основанием, изготовленные из прозрачного материала (желательно пластика с целью предотвращения поломки, облегчения дезинфекции и утилизации контейнера); крышка должна герметично закрывать контейнеры и легко открываться; контейнер не должен содержать химические вещества, негативно влияющие на жизнеспособность находящихся в мокроте бактерий.

11. Набор реагентов для окраски микропрепаратов по Граму.

12. Питательные среды для культивирования *S. pneumoniae* (например, кровяной агар, CNA-агар).

13. Питательные среды для культивирования бактерий рода *Haemophilus* (например, шоколадный агар), грамотрицательных бактерий и *S. aureus* (агар Эндо, МакКонки, желточно-солевой агар).

14. Чашки бактериологические (Петри) для выращивания микробиологических культур.

15. Стекла предметные и покровные стандартных размеров для микропрепаратов.

16. Штативы и подносы для пробирок и контейнеров, транспортирования чашек Петри, кюветы и штативы-рельсы для фиксации и окрашивания мазков.

17. Петли бактериологические.

18. Дозаторы переменного объема полуавтоматические.

19. Наконечники стерильные для дозаторов переменного объема.

20. Шпатели Дригальского стерильные.

21. Посуда мерная лабораторная стеклянная.

22. Пипетки пластиковые пастеровские для стандартизации объема и переноса жидкостей.

23. Стандарт мутности по МакФарланду или прибор для определения концентрации бактериальных клеток.

24. Диски с антибиотиками (оптохин, оксациллин, цефокситин и др.).

25. Иммуноферментный анализатор в комплекте.

26. Люминесцентный микроскоп в комплекте.

27. Оборудование для ПЦР-лаборатории, укомплектованной в соответствии с МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

28. Диагностические наборы реагентов (тест-системы) для выявления антигенов и ДНК/РНК возбудителей пневмоний, а также специфических антител к возбудителям пневмоний, разрешенные к применению в Российской Федерации в установленном порядке.

6. Диагностика внебольничных пневмоний

6.1. Диагностика пневмококковой пневмонии

Streptococcus pneumoniae (S. pneumoniae) является самым частым бактериальным возбудителем ВП. Пневмококковые пневмонии регистрируются у пациентов любого возраста, встречаются как в амбулаторной практике, так и в стационаре (в т. ч. среди госпитализированных в ОРИТ). Рост заболеваемости ВП пневмококковой этиологии в Северном полушарии отмечается в зимнее время года; пневмококковая пневмония чаще регистрируется среди пациентов с сопутствующими хроническими

заболеваниями – хроническая обструктивная болезнь легких, сахарный диабет, алкоголизм, аспления, иммунодефицит, нередко протекает с бактериемией (до 25—30 %).

Для пневмококковой ВП, как правило, характерны острое начало, высокая лихорадка, боли в грудной клетке. Однако клинико-лабораторные и рентгенологические проявления ВП, вызванной *S. pneumoniae*, недостаточно специфичны и не могут считаться адекватным предиктором этиологии заболевания.

Для диагностики пневмококковой ВП наиболее часто используют культуральные методы исследования. Клиническим материалом для исследования является мокрота, венозная кровь, реже – инвазивные респираторные образцы (БАЛ, материал, полученный при бронхоскопии, защищенной браш-биопсии и др.) и плевральная жидкость.

При исследовании мокроты особое внимание следует обратить на необходимость оценки качества доставленного образца. Проведение анализа необходимо начать с приготовления мазка, так как результаты микроскопии влияют не только на оценку пригодности материала, но и на дальнейшее направление бактериологического исследования. Критериями пригодности мокроты для бактериологического исследования является наличие более 25 сегментоядерных лейкоцитов и не более 10 эпителиальных клеток в поле зрения при просмотре, как минимум, 20 полей зрения мазка, окрашенного по Граму (под увеличением ×100). При микроскопии мазка, окрашенного по Граму (под увеличением ×1 000 при использовании иммерсионного объектива), обнаруживаются грамположительные кокки (чаще – ланцетовидные диплококки) диаметром 0,5—1,25 мкм, не имеющие спор и жгутиков; большинство имеет полисахаридную капсулу.

Исследование плевральной жидкости предусматривает бактериоскопию мазка, окрашенного по Граму с последующим культуральным исследованием. Оно выполняется при наличии плеврального выпота и условий безопасного проведения плевральной пункции (визуализация на латерограмме свободно смещаемой жидкости с толщиной слоя > 1,0 см). Культуральное исследование инвазивных респираторных образцов при ВП рекомендуется проводить пациентам с иммунодефицитом, данный метод может использоваться в отдельных случаях при тяжелой ВП, а также неэффективности стартовой антибактериальной терапии (АБТ).

Клинически значимыми при остром воспалительном процессе считаются микроорганизмы, выделенные из БАЛ в количестве $\geq 10^4$ КОЕ/мл, из биоптата, полученного с помощью защищенных щеток – $\geq 10^3$ КОЕ/мл, мокроты – $\geq 10^5$ КОЕ/мл.

Для выделения *S. pneumoniae* из клинического материала необходимо использовать питательные среды, обогащенные дефибринированной кровью животных (барана, лошади или козла) в концентрации 5 %. Несколько худшие результаты даёт применение дефибринированной крови человека. В связи с дефицитностью дефибринированной крови в практических лабораториях и небольшим сроком её хранения следует помнить о возможности использования для выделения пневмококков коммерчески приготовленного шоколадного агара, который параллельно применяется для выделения гемофилов. Еще одно условие культивирования *S. pneumoniae* – инкубация в атмосфере с повышенным до 3—7 % содержанием CO_2, так как он является факультативным анаэробом. Вероятность выделения *S. pneumoniae* из респираторных образцов увеличивается при использовании селективных сред, содержащих добавки, ингибирующие рост сапрофитных и грамотрицательных микроорганизмов (колистин, налидиксовая кислота, гентамицин).

Ключевым тестом дифференциации пневмококков от других α-гемолитических стрептококков является чувствительность к оптохину (тест основан на способности оптохина селективно подавлять рост пневмококка в отличие от других зеленящих стрептококков). Однако среди *S. pneumoniae* растет число оптохинорезистентных штаммов, что требует использования альтернативных методов идентификации возбудителя (лизис в присутствии солей желчных кислот, тест Нейфельда, агглютинация с диагностическими пневмококковыми сыворотками).

Информативность культурального исследования респираторных образцов и крови в значительной степени зависит от соблюдения общепринятых правил их сбора, хранения и транспортирования (см. прилож.). Кроме того, вероятность выявления *St. pneumoniae* значительно снижается при получении клинических образцов на фоне системной АБТ. Для культурального исследования крови предпочтительно использовать коммерческие флаконы с питательными средами.

Среди некультуральных методов диагностики пневмококковой пневмонии наибольшее распространение в последние годы получил иммунохроматографический тест, предусматривающий выявление пневмококкового клеточного полисахаридного антигена в моче. Основное его преимущество – возможность использования «у постели больного» в связи с простотой выполнения и быстрым получением результата. Пневмококковый экспресс-тест демонстрирует приемлемую чувствительность (50—80 %) и достаточно высокую специфичность (> 90 %) при ВП у взрослых по сравнению с традиционными методами. К недостаткам теста относятся возможность получения ложноположительных

результатов при пневмококковом носительстве (тест не рекомендуется проводить у детей младше 6 лет) и у лиц, недавно перенесших ВП.

Разработаны методы выявления *St. pneumoniae* в клиническом материале с помощью ПЦР. В качестве мишеней для амплификации используются гены аутолизина (*lyt*A), пневмококкового поверхностного антигена (*psa*A) и пневмолизина (*ply*) и другие гены мишени. Однако данные методы не получили широкого распространения в клинической практике и их место в этиологической диагностике ВП требует уточнения.

6.2. Диагностика других бактериальных пневмоний

Важным клинически значимым бактериальным возбудителем ВП является *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*). Внебольничную пневмонию, как правило, вызывают нетипируемые штаммы *H. influenzae*. По данным ряда исследований, *H. influenzae* чаще встречается у пациентов с сопутствующей ХОБЛ и активных курильщиков, частота инфицирования данным возбудителем выше у пациентов с нетяжелой ВП.

Представители семейства *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и др.) и *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)* выявляются менее чем у 5 % пациентов с ВП и относятся к категории редких возбудителей. Однако значимость данных микроорганизмов может возрастать у пациентов с тяжелой ВП, а инфицирование в несколько раз увеличивает вероятность неблагоприятного прогноза.

Как показывают эпидемиологические исследования, частота встречаемости энтеробактерий выше у пациентов с хроническими сопутствующими заболеваниями, у лиц, злоупотребляющих алкоголем, при аспирации, в случае недавней госпитализации и предшествующей АБТ. Дополнительными факторами риска инфицирования *P. aeruginosa* являются хронические бронхолегочные заболевания (тяжелая ХОБЛ, бронхоэктазы), длительный прием системных стероидов, цитостатиков.

Еще один бактериальный возбудитель – *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) – редко встречается среди амбулаторных пациентов с ВП, в то же время у лиц с тяжелым течением заболевания его удельный вес может возрастать до 10 % и более. К инфицированию *S. aureus* предрасполагают многие факторы – пожилой возраст, проживание в домах престарелых, наркомания, злоупотребление алкоголем. Известно, что актуальность *S. aureus* как возбудителя ВП значительно возрастает во время эпидемий гриппа.

Каких-то специфических клинических, лабораторных или рентгенологических признаков, типичных для ВП, вызванной данными возбу-

дителями, и позволяющих отличить ее от пневмоний другой этиологии, не существует. В отдельных случаях, преимущественно у лиц с иммуносупрессией или злоупотребляющих алкоголем, *K. pneumoniae* может вызывать долевую пневмонию с локализацией поражения в верхней доле легкого, быстрым прогрессированием симптомов заболевания и высокой летальностью.

Для этиологической диагностики ВП, вызванной данными возбудителями, основное значение имеет культуральный метод исследования. *H. influenzae*, как и пневмококк, относится к категории «прихотливых» микроорганизмов, требующих для культивирования наличия в питательных средах факторов X, V и 5—7 % CO_2 в атмосфере инкубации. Для выделения *H. influenzae* из клинического материала обычно используется шоколадный агар или селективный агар для выделения бактерий рода *Haemophilus*. Посев клинического материала с целью выявления представителей семейства *Enterobacteriaceae* и *P. aeruginosa* осуществляется на селективные среды для выделения грамотрицательных бактерий (агар Эндо, МакКонки и др.), *S. aureus* – на желточно–солевой агар, маннитол–солевой агар и др.

Клиническим материалом для исследования может являться мокрота, венозная кровь, инвазивные респираторные образцы и плевральная жидкость. При исследовании мокроты, как и для выявления пневмококков, важное значение имеет оценка качества собранного образца. Исследование плевральной жидкости выполняется при наличии плеврального выпота и условий безопасного проведения плевральной пункции, инвазивных респираторных образцов – только по отдельным показаниям.

Следует отметить, что нетипируемые штаммы *H. influenzae* и *S. aureus* входят в состав нормальной микрофлоры верхних дыхательных путей (ВДП), причем частота бессимптомного носительства может быть достаточно высокой. С возрастом, при наличии хронических сопутствующих заболеваний, а также недавней системной АБТ возрастает частота колонизации полости рта и ВДП энтеробактериями. Этот факт необходимо учитывать при клинической интерпретации результатов бактериологического исследования респираторных образцов, особенно мокроты.

Информативность культурального исследования респираторных образцов и крови в значительной степени зависит от соблюдения общепринятых правил их сбора, хранения и транспортирования. Идентификация основана на определении питательных потребностей возбудителей и результатах биохимических тестов. Для идентификации всех указанных микроорганизмов разработаны коммерческие биохимические

панели и наборы реагентов, могут использоваться автоматизированные микробиологические анализаторы, которые уменьшают трудоемкость культурального исследования.

При подозрении на ВП, вызванную *S. aureus,* важное значение приобретает не только выделение и идентификация возбудителя, но и определение его чувствительности к оксациллину. Несмотря на отсутствие документированных фактов выявления метициллинорезистентного *S. aureus* у пациентов с ВП на территории Российской Федерации опасность их появления и распространения является вполне реальной. Среди фенотипических методов детекции метициллинорезистентности наиболее часто используются тестирование диско-диффузионным методом с диском, содержащим 30 мкг цефокситина или 1 мг оксациллина, или скрининг на агаре Мюллера-Хинтон с добавлением 4 %-й NaCl и оксациллина в концентрации 6 мг/л. Для подтверждения инфицирования метициллинорезистентным *S. aureus* разработаны коммерческие тест-системы, основанные на выявлении в клиническом материале гена *mecA* методом ПЦР.

6.3. Диагностика пневмонии, вызванной Mycoplasma pneumoniae

Возбудителем респираторного микоплазмоза является *Mycoplasma pneumoniae* – представитель класса *Mollicutes*, объединяющего бесстеночные, способные к автономному существованию бактерии, по уровню структурной организации занимающие промежуточное положение между бактериями и вирусами.

Респираторный микоплазмоз – распространенное антропогенное заболевание. Особенностью респираторного микоплазмоза является периодичность эпидемий с интервалами, по данным разных источников, варьирующими от 3 до 7 лет. Распространению инфекции способствует частота и длительность контактов среди лиц, пребывающих в закрытых и полузакрытых коллективах (военнослужащие, школы-интернаты), особенно при их формировании.

В 3—10 % случаев микоплазменной инфекции рентгенологически диагностируется пневмония. При пневмонии, вызванной *M. pneumoniae*, другие бактериальные или вирусные возбудители, как правило, не обнаруживаются, однако в редких случаях также выделяется *S. pneumoniae*. В 1—5 % случаев заболеваний респираторным микоплазмозом требуется госпитализация.

Микоплазменная пневмония сопровождается частым мучительным и продолжительным кашлем со скудной вязкой мокротой, которая плохо эвакуируется, отмечаются боли в грудной клетке, может развиться об-

струкция бронхов. Интоксикация нерезко выражена. Физикальные изменения в лёгких отсутствуют или слабо выражены. Рентгенологическая картина весьма вариабельна. В большинстве случаев выявляются поражения интерстиция, у части больных пневмония протекает по типу очаговой или сегментарной, иногда воспалительные изменения носят смешанный характер. Явления лёгочной недостаточности нехарактерны для микоплазменной пневмонии. Микоплазменная пневмония обычно имеет благоприятное течение, в редких случаях течение очень тяжёлое.

Диагностика микоплазменной пневмонии только на основании клинических или рентгенологических данных невозможна, поскольку не имеет патогномонических черт. Основная роль в подтверждении микоплазменной этиологии пневмонии отводится лабораторной этиологической диагностике. Для этиологической диагностики микоплазменной пневмонии применяют:

• обнаружение ДНК *M. pneumoniae* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), основным методом для прямого выявления ДНК *M. pneumoniae* является на настоящий момент стандартная полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией методом электрофоретического разделения ДНК, однако наибольшей специфичностью и чувствительностью обладает ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ);

• выявление антигена микоплазм в реакции прямой иммунофлуоресценции (РИФ);

• серологические исследования по обнаружению специфических антител класса IgM и IgG к *M. pneumoniae* в сыворотках крови методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Mycoplasma pneumoniae относится к трудно культивируемым микроорганизмам; процесс выделения занимает 3—5 недель, поэтому культуральный метод не может быть рекомендован для использования диагностическими лабораториями.

С целью быстрой этиологической диагностики пневмонии рекомендуется использовать ПЦР при исследовании биологического материала, полученного из нижних дыхательных путей (мокрота при глубоком откашливании, аспираты из трахеи, мокрота, полученная в результате индукции посредством ингаляции гипертонического раствора натрия хлорида, жидкость бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), получаемая с помощью фибробронхоскопии).

При получении положительного результата ПЦР при исследовании биологического материала, полученного из нижних дыхательных путей, этиология пневмонии считается установленной. При невозможности получения биологического материала из нижних дыхательных путей для

ПЦР допустимо использовать мазки из верхних дыхательных путей (объединенный мазок из носоглотки и задней стенки глотки), и при получении положительного результата следует считать этиологию пневмонии предположительно установленной. Однако получение отрицательного результата ПЦР при исследовании мазков из верхних дыхательных путей не может свидетельствовать об отсутствии микоплазменной инфекции. В этом случае рекомендуется серологическая диагностика с учетом совокупности результатов по обнаружению специфических антител классов IgM и IgG в парных сыворотках, исследуемых одновременно.

С целью ретроспективной диагностики, когда больной уже находится в стадии реконвалесценции, необходимо использовать серологические исследования.

Первичный иммунный ответ характеризуется синтезом IgM-антител через 1—3 недели с момента заражения, обнаружение которых свидетельствует об острой фазе инфекции. Иммуноглобулины классов G появляются к концу 3—4 недели. Диагноз микоплазменной респираторной инфекции подтверждает 4-кратная сероконверсия специфических антител в парных сыворотках крови.

Непосредственное обнаружение антигенов *M. pneumoniae* в различных биосубстратах (мазки из носоглотки, лаважная жидкость, биоптаты), полученных от больных с респираторной патологией, до настоящего времени в отдельных диагностических лабораториях проводят с использованием РИФ. Этот метод в сочетании с выявлением специфических антител к микоплазме в ИФА дает возможность подтвердить заболевание, вызванное *Mycoplasma pneumoniae*. Следует учитывать, что гуморальные антитела сохраняются несколько лет.

Для достоверной и окончательной этиологической диагностики микоплазменной пневмонии с учетом возможности персистенции данного возбудителя в организме человека без выраженных клинических проявлений рекомендуется дополнительное подтверждение установленного диагноза каким-либо из перечисленных выше методов.

6.4. Диагностика пневмонии, вызванной Chlamydophila pneumoniae

Chlamydophila pneumoniae – патогенная для человека грамотрицательная бактерия с облигатным внутриклеточным типом паразитирования, обладает тропизмом к клеткам столбчатого цилиндрического эпителия слизистых оболочек человека, в частности, к эпителию бронхиол, бронхов, а также к альвеолярным макрофагам, моноцитам. Для *C. pneumoniae*-инфекции характерна генерализация процесса, вследст-

вие чего возбудитель может инфицировать эндотелиальные клетки сосудов, синовиальные клетки, гепатоциты и ткани нервной системы.

C. pneumoniae вызывает пневмонии различной тяжести, длительно протекающие бронхиты, фарингиты, синуситы. Пневмония, вызванная *C. pneumoniae* обычно имеет благоприятное течение, в редких случаях течение очень тяжёлое.

Микст-инфекция, например сочетание с пневмококком или наличие тяжелых сопутствующих заболеваний, особенно у пожилых лиц, осложняет течение заболевания и увеличивает риск летального исхода. Нередко инфекция протекает малосимптомно.

В группу риска попадают все возраста, но частота заболеваемости хламидийной пневмонией выше у детей школьного возраста. Заболеваемость среди мужчин выше, чем среди женщин. Эпидемические вспышки происходят каждые 4—10 лет. Описаны эпидемиологические вспышки в изолированных и полуизолированных коллективах, случаи внутрисемейной передачи хламидийной инфекции.

Ни один из известных в настоящее время методов диагностики хламидийной пневмонии не обеспечивает 100 %-ю надежность выявления возбудителя, что диктует необходимость сочетания не менее двух методов.

Микробиологическое выделение *C. pneumoniae* имеет ограниченное применение ввиду того, что является длительным и трудоемким процессом, характеризуется низкой чувствительностью и доступно только специализированным лабораториям. Однако в случае выделения жизнеспособного возбудителя диагноз может быть поставлен с наибольшей достоверностью без необходимости применения подтверждающих тестов. Культуральное выделение указывает на активный инфекционный процесс, так как при персистентной инфекции возбудитель переходит в некультивируемое состояние.

Наиболее специфичным и чувствительным методом выявления возбудителя является ПЦР-диагностика. Высокая чувствительность и отсутствие ложноположительных результатов могут быть обеспечены использованием только лицензированных наборов для эффективного выделения ДНК из клинического материала и наборов для постановки ПЦР современного поколения на основе ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Метод не дает возможность дифференцировать острую и хроническую инфекцию.

С целью быстрой этиологической диагностики пневмонии рекомендуется использовать ПЦР при исследовании биологического материала, полученного из нижних дыхательных путей (мокрота при глубо-

ком откашливании, аспираты из трахеи, мокрота, полученная в результате индукции посредством ингаляции гипертонического раствора натрия хлорида, жидкость бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), получаемая с помощью фибробронхоскопии). Серологические тесты применяют для ретроспективной диагностики и ретроспективного анализа природы эпидемических вспышек.

При получении положительного результата ПЦР при исследовании биологического материала, полученного из нижних дыхательных путей, этиология пневмонии считается установленной. Однако при пневмониях, вызванных *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae,* кашель часто бывает непродуктивным, в таких случаях для ПЦР рекомендуется использовать мазки из верхних дыхательных путей (объединенный мазок из носоглотки и задней стенки глотки), и при получении положительного результата следует считать этиологию пневмонии предположительно установленной.

При получении отрицательного результата ПЦР при исследовании мазков из верхних дыхательных путей при подозрении на инфекцию, вызванную *C. pneumoniae*, на основании эпидемиологических или клинических данных рекомендуется серологическая диагностика с учетом совокупности результатов по обнаружению специфических антител классов IgM и IgG в парных сыворотках, исследуемых одновременно.

С целью ретроспективной диагностики, когда больной находится в стадии реконвалесценции, необходимо использовать серологические исследования.

В настоящее время для обнаружения специфических IgM-, и IgG-антител к *C. pneumoniae* используют метод иммуноферментного анализа (ИФА) или реакцию иммунофлюоресценции (РИФ). Определены серологические критерии острой *C. pneumoniae*-инфекции: 4-кратное нарастание титров IgG-антител в парных сыворотках или однократное выявление IgM-антител в титре $\geq 1 : 16$.

Для достоверной и окончательной этиологической диагностики хламидийной пневмонии с учетом возможности персистенции данного возбудителя в организме человека без выраженных клинических проявлений рекомендуется дополнительное подтверждение установленного диагноза каким-либо из перечисленных выше методов.

6.5. Диагностика пневмонии, вызванной Legionella pneumonia

В связи со сходством клинических проявлений и симптоматики легионеллезной и пневмококковой пневмонии быстрая и эффективная лабораторная диагностика приобретает решающее значение для выбора

тактики этиотропной терапии больных. В 1999 г. ВОЗ и в 2002 г. Европейской рабочей группой по легионеллезу в качестве диагностических критериев приняты стандарты, в соответствии с которыми диагноз легионеллеза в случае острой инфекции нижних дыхательных путей (клинически и рентгенологически подтвержденной) считается установленным:

1) при выделении культуры легионелл из отделяемого респираторного тракта или легочной ткани;

2) при 4-кратном или более нарастании титра специфических антител к *Legionella pneumophila* серогруппа 1 в реакции непрямой иммунофлюоресценции;

3) при определении растворимого антигена *Legionella pneumophila* серогруппа 1 в моче иммуноферментным (ИФА) или иммунохроматографическим методом (ИХА).

При отсутствии сыворотки крови, взятой в ранние сроки болезни, выявление достоверно высокого уровня антител к *Legionella pneumophila* серогруппа 1 (1 : 128 и выше) в одиночной сыворотке методом непрямой иммунофлюоресценции позволяет считать диагноз легионеллеза предположительно установленным. Аналогичным образом интерпретируются результаты, полученные на основании выявления возбудителя или его ДНК в респираторном секрете или легочной ткани с помощью прямой иммунофлюоресценции или ПЦР.

Пункты 2 и 3 стандартов лабораторной диагностики в настоящее время распространяется только на антитела и антиген, определяемые для *Legionella pneumophila* серогруппы 1. Для других серогрупп *Legionella pneumophila* результаты, получаемые по определению антител или выявлению антигена в моче, позволяют установить лишь предполагаемый диагноз. Выделение культуры возбудителя остается единственным методом стандартов, устанавливающим окончательный диагноз в случае инфекции, вызываемой другими серогруппами *Legionella pneumophila* или видами *Legionella spp.* В то же время следует отметить, что более 80 % спорадических и групповых случаев легионеллеза вызваны штаммами *Legionella pneumophila* серогруппа 1, а при эпидемических вспышках внебольничных пневмоний этиологическое значение штаммов *L. pneumophila* серогруппа 1 подтверждено в 96 % случаев.

Основным методом стандартов, позволяющим осуществлять в настоящее время своевременную диагностику и мониторинг легионеллезной инфекции, является определение легионеллезного антигена в моче иммунохроматографическим или иммуноферементным методом. Метод позволяет окончательно подтвердить диагноз в течении 1—2 ч. Превос-

ходство данного метода над другими, включенными в стандарт, методами состоит прежде всего в сроках исследования и доступности клинического материала.

Бактериологический метод занимает не менее 4—5 суток, причем требуются инвазивные процедуры для получения материала бронхоскопии, биопсии, так как из мокроты, особенно после начала этиотропной терапии, возбудитель удается выделить далеко не всегда. Выявление диагностического нарастания титров антител в реакции непрямой иммунофлюоресценции возможно лишь на 3-й неделе заболевания, когда проведен курс антибиотикотерапии и исход заболевания обычно ясен. Необходимость исследования парных сывороток определяет ретроспективный характер диагностики легионеллеза данным методом.

Метод ПЦР может быть рекомендован прежде всего для исследования БАЛ или биопсии при подозрении на легионеллезную пневмонию у иммунокомпрометированных больных. Если у данной категории больных инфекция вызвана штаммами *L. pneumophila*, не принадлежащими к серогруппе 1, то данный метод является единственным, позволяющим быстро установить диагноз.

6.6. Диагностика пневмонии, вызванной Pneumocystis jiroveci

Пневмоцистоз, как правило, протекает в виде острых респираторных заболеваний, обострений хронических бронхолегочных заболеваний, обструктивного бронхита, ларингита, а также по типу пневмоний с нарушениями газообмена (интерстициальных пневмоний).

Типичная рентгенологическая картина при пневмоцистной пневмонии представлена двусторонней прикорневой интерстициальной инфильтрацией легочной ткани с нарастающей интенсивностью и большим объемом поражения в прямой зависимости с прогрессированием болезни. Реже встречаются единичные и множественные уплотнения легочной ткани, верхнедолевые инфильтраты и пневмоторакс. Плеврит и увеличение внутригрудных лимфатических узлов встречаются достаточно редко. При отсутствии патологии на рентгенограммах, КТ высокого разрешения может обнаруживать изменения по типу матового стекла или ячеистой деформации легочного рисунка.

У взрослых пневмоцистная пневмония, как правило, развивается на фоне вторичного иммунодефицита. Инкубационный период краткий – от 2 до 5 суток, начало – острое. Пневмоцистная пневмония может развиться у больных, получающих иммуносупрессивную терапию (кортикостероиды). При медикаментозной иммуносупрессии это заболевание

проявляется на фоне снижения дозы кортикостероидов. Продромальный период обычно продолжается 1—2 недели; у больных СПИД – 10 дней.

Пневмоцистная пневмония при СПИД, как правило, характеризуется вялым хроническим процессом. Первоначально аускультативная симптоматика не выявляется. К летальному исходу приводит дыхательная недостаточность, связанная с резким нарушением вентиляции легких и газообмена. Возможны также абсцессы, спонтанный пневмоторакс и экссудативный плеврит.

Пневмоцистоз у детей развивается обычно на 4—6-м месяце жизни, когда иммунная система новорожденного еще полностью не сформировалась. Наиболее подвержены этому заболеванию недоношенные, больные рахитом, с гипотрофией и поражениями ЦНС.

У детей раннего возраста пневмоцистоз протекает как классическая интерстициальная пневмония с четкими стадиями патологических процессов.

На основании морфологических изменений при манифестном течении заболевания выделяют три стадии пораженного легкого:

- отечная (7—10 дней);
- ателектатическая (до 4 недель);
- эмфизематозная (ее продолжительность вариабельна).

Группами риска в отношении инфицированности *Pneumocystis jiroveci* являются:

- дети недоношенные, ослабленные новорожденные и дети раннего возраста с гипогаммаглобулинемией, гипотрофией и рахитом;
- больные лейкозом, онкологические больные, реципиенты органов, получающие иммунодепрессанты;
- больные туберкулезом, цитомегалией и другими инфекциями;
- ВИЧ-инфицированные.

Для диагностики пневмоцистоза необходимо использовать комплекс лабораторных методов исследования, включающий паразитологический, иммунологические методы и ПЦР-диагностику.

Для окраски паразитологических препаратов с целью выявления *Pneumocystis jiroveci* используют классические методы: импрегнация метенамин-серебряным нитратом по Гомори, окраска толуидиновым синим, гематоксилином и эозином, по Грамму и раствором Шиффа, а также методом Романовского-Гимза.

Наиболее универсальным для выявления цист, трофозоитов и спорозоитов является метод Романовского-Гимза. Витальная окраска нейтральным красным также позволяет выявить возбудителя в активной фазе.

Все перечисленные методы окраски требуют высокой квалификации исследователя для точной идентификации *Pneumocystis jiroveci*; к тому же эти методы служат лишь для индикации и направлены на общие грибные полисахариды оболочки цист.

Иммунофлюоресцентный метод (РИФ) для выявления цист и трофозоитов с использованием моноклональных или поликлональных антител в лаважной жидкости обладает более высокой специфичностью и чувствительностью, нежели гистохимическое окрашивание препаратов.

Иммунологический метод, выявляющий специфические антитела классов IgG и IgM (ИФА), также играет значительную роль в диагностике пневмоцистоза, особенно при диагностике, когда у больного невозможно взять лаважную жидкость или мокроту. Антитела класса G среди здорового населения выявляют достаточно часто (60—80 %). Поэтому исследование антител должно происходить в динамике при обязательном титровании сыворотки. Выявление 4-кратного нарастания IgG и/или определение антител IgM против *Pneumocystis jiroveci* говорит об остром инфекционном процессе, вызванном этим возбудителем.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является одним из высокочувствительных методов диагностики, позволяющим выявлять единичные клетки или фрагменты ДНК возбудителя *Pneumocystis jiroveci* в мокроте или бронхоальвеолярном лаваже.

Для достоверной этиологической диагностики пневмоцистной пневмонии с учетом возможности персистенции данного возбудителя в организме человека без выраженных клинических проявлений рекомендуется комплексное исследование: на основе методов прямого выявления возбудителя (паразитологическим методом, РИФ или ПЦР) и определения серологических маркеров в динамике.

6.7. Диагностика вирусных и вирусно-бактериальных пневмоний

Вирусную или вирусно-бактериальную этиологию пневмонии у взрослых можно подозревать во время подъема заболеваемости гриппом и ОРВИ, а также при возникновении групповых случаев заболевания в течение месяца после формирования закрытых и полузакрытых коллективов. В группу риска тяжелого течения вирусных пневмоний входят лица, страдающие сердечной недостаточностью и хроническими заболеваниями бронхолегочной системы. Сопутствующей патологией при тяжелом течении гриппа являются также ожирение, сахарный диабет, состояние беременности, особенно в третьем триместре.

Основными возбудителями вирусных и вирусно-бактериальных пневмоний у иммунокомпетентных взрослых считают вирусы гриппа А

и В, аденовирусы, РС-вирус, вирусы парагриппа; реже обнаруживается метапневмовирус. У взрослых больных гриппом в 10—15 % случаев развиваются осложнения, причем 80 % из них приходится на пневмонию.

Важна диагностика вирусных инфекций при ВП у детей в этиологической структуре которых вирусные инфекции играют существенную роль.

Современные методы этиологической диагностики острых вирусных инфекций дыхательных путей основаны прежде всего: на выявлении РНК/ДНК возбудителей методами амплификации нуклеиновых кислот, в частности, с помощью наиболее широко используемой ПЦР; на обнаружении антигенов методами иммунохроматографии (ИХА), иммуноферментного анализа (ИФА), иммунофлюоресценции (РИФ). Сохраняют значение в основном для ретроспективной диагностики методы по обнаружению специфических антител в сыворотке крови (реакция связывания комплемента (РСК), реакция нейтрализации (РН), реакция торможения гемагглютинации (РТГА), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), иммуноферментный анализ (ИФА)). Культивирование возможно для вирусов гриппа А и В, респираторно-синцитиального вируса, вирусов парагриппа 1—3-го типов, метапневмовируса человека и аденовирусов.

Культуральные исследования отличаются трудоемкостью и продолжительностью, в рутинной практике используется только при мониторинге гриппа, при этом первоначальное обнаружение положительных образцов проводится в ПЦР, далее проводится выделение в культуре.

Реакции иммунофлюоресценции позволяют обнаруживать антигены вирусов гриппа, респираторно-синцитиального вируса, вирусов парагриппа 1—3 и аденовирусов. Материал для исследований методом иммунофлуоресценции необходимо собирать не позднее трех дней от начала респираторной инфекции (в острой фазе заболевания, поскольку метод наиболее эффективен, когда внутриклеточное содержание вирусных антигенов бывает наиболее высоким), что делает данный метод малоинформативным для этиологической диагностики пневмоний. Помимо этого метод отличается субъективностью при интерпретации результатов анализа.

Серологические тесты обнаруживают антитела к респираторно-синцитиальному вирусу (РН, РСК, РНГА, ИФА), вирусам парагриппа 1—4 (РТГА, РСК, ИФА), аденовирусам (ИФА), риновирусам (РСК); исследование, как правило, носит ретроспективный характер. По сравнению с РСК ИФА отличается большей чувствительностью. При интерпретации оценивают изменение титра специфических антител в динами-

ке в парных сыворотках (полученных с интервалом в 2 недели), и их результаты в значительной степени зависят от состояния иммунной системы пациента.

Признанным доказательством первично вирусной пневмонии (или смешанной вирусно-бактериальной пневмонии) согласно международным критериям (ESCMID 2011, BTS, 2009—2011), 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. С этой целью, мазки у пациента берут двумя разными зондами со слизистой нижнего носового хода, а затем с задней стенки ротоглотки, при этом тампоны с обоих зондов после взятия мазков последовательно отламываются в одну пробирку.

Однако, в случае вирусов гриппа, реплицирующихся в ткани легких (A/H5N1, A/H1N1pdm2009) на второй неделе пневмонии концентрация вируса в мазках уже может быть недостаточной для его обнаружения, особенно при неадекватном заборе материала. Кроме того, с целью одновременного обнаружения как вирусных, так и бактериальных агентов, целесообразно использовать материал нижних дыхательных путей (мокрота при глубоком откашливании, мокрота, полученная в результате индукции посредством ингаляции гипертонического раствора натрия хлорида, аспираты из трахеи, жидкость бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), получаемая с помощью фибробронхоскопии).

Для идентификации наиболее значимых возбудителей острых респираторных вирусных инфекций: вирусы гриппа A и B, РС-вирус, метапневмовирус, вирусы парагриппа 1—4, коронавирусы (229E, OC43, NL63, HKUI), риновирусы, аденовирусы (B, C, E), бокавирус доступны наборы реагентов для ПЦР в форматах с электрофоретической детекцией, детекцией по конечной точке флуоресценции, а также с детекцией накопления продуктов амплификации в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ). Максимального уровня специфичности и чувствительности достигают тесты на основе ПЦР в режиме реального времени, преимуществом обладают тесты с одновременным определением нескольких возбудителей. Использование в качестве мишеней специфичных консервативных участков генома вирусов обусловливает высокие показатели диагностической чувствительности и специфичности ПЦР, приближающиеся к 100 %, по сравнению с культуральным исследованием. При диагностике гриппа реализуется возможность определения субтипа ви-

русов гриппа А, в том числе – высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H5N1 и нового пандемического варианта A/H1N1pdm2009, так называемого вируса гриппа свиней.

Полимеразная цепная реакция в формате электрофоретической детекции требует особых мер предотвращения контаминации (ложноположительных результатов), достигаемых проведением специальных мероприятий и соблюдением особых правил организации лаборатории согласно МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

Этиологию «пневмонии, вызванной вирусом гриппа», следует считать установленной в случае обнаружения методом ПЦР РНК вируса гриппа (или в сочетании с другими вирусами) в материале нижних дыхательных путей при отрицательном результате бактериологического исследования крови (или при отсутствии ДНК бактериальных возбудителей пневмоний в крови по результатам ПЦР, или при обнаружении незначимых концентраций ДНК в материале нижних дыхательных путей в количественной ПЦР). При невозможности получения материала нижних дыхательных путей гриппозная этиология пневмонии с большой долей вероятности может быть доказана в случае обнаружения РНК вируса гриппа в мазках из носоглотки и ротоглотки.

Этиология пневмонии, вызванной другими респираторными вирусами, считается установленной в случае обнаружения методом ПЦР РНК/ДНК одного респираторного вируса (или одновременно нескольких вирусов) в материале нижних дыхательных путей при отрицательном результате бактериологического исследования крови (или при отсутствии ДНК бактериальных возбудителей пневмоний в крови по результатам ПЦР, или при обнаружении незначимых концентраций ДНК в материале нижних дыхательных путей в количественной ПЦР).

Вирусная этиология пневмонии считается предположительно установленной в случае обнаружения методом ПЦР РНК/ДНК одного респираторного вируса (или одновременно нескольких вирусов) в мазках из носоглотки и ротоглотки при отрицательном результате бактериологического исследования крови (или при отсутствии ДНК бактериальных возбудителей пневмоний в крови по результатам ПЦР, или при обнаружении незначимых концентраций ДНК в материале нижних дыхательных путей в количественной ПЦР), а также если бактериологические исследования не проводились.

Вирусная этиология пневмонии считается предположительно установленной в случае обнаружения методом РИФ антигенов одного рес-

пираторного вируса (или одновременно нескольких вирусов) при отрицательном результате бактериологического исследования крови (или при отсутствии ДНК бактериальных возбудителей пневмоний в крови по результатам ПЦР, или при обнаружении незначимых концентраций ДНК в материале нижних дыхательных путей в количественной ПЦР), а также если бактериологические исследования не проводились.

Вирусно-бактериальная этиология пневмонии считается установленной в случае обнаружения методом ПЦР РНК/ДНК одного вируса (или одновременно нескольких вирусов) в материале нижних дыхательных путей при положительном результате бактериологического исследования крови (или обнаружении ДНК значимых концентраций в крови или в материале нижних дыхательных путей в количественной ПЦР).

Вирусно-бактериальная этиология пневмонии считается предположительно установленной в случае обнаружения методом РИФ или ИХА антигенов одного респираторного вируса (или одновременно нескольких вирусов) при положительном результате бактериологического исследования крови (или обнаружении ДНК значимых концентраций в крови или в материале нижних дыхательных путей в количественной ПЦР).

Результаты серологических исследований позволяют судить о наличии или отсутствии вирусной инфекции, на фоне которой развилась пневмония.

6.8. Дифференциальная диагностика с зоонозными заболеваниями, вызывающими поражения легких, и туберкулезом

Дифференциальная диагностика с зоонозными заболеваниями, вызывающими поражения легких (орнитоз, лихорадка Ку, туляремия и др.) проводится по эпидемиологическим показателям и в эндемичных для данных возбудителей регионах в соответствии с санитарными правилами «Профилактика орнитоза», «Профилактика лихорадки Ку», «Профилактика туляремии». Дифференциальная диагностика с туберкулезом является также важным и необходимым компонентом обследования больных тяжелыми пневмониями.

7. Алгоритм диагностики внебольничных пневмоний

Алгоритм лабораторной диагностики типичной ВП (у пациентов с отсутствием выраженных нарушений иммунитета) различен для пневмоний тяжелого и нетяжелого течения, для пациентов с выраженными нарушениями иммунитета и детей. Своевременная этиологическая диаг-

ностика ВП особенно важна при пневмониях тяжелого течения у пациентов, госпитализированных в ОРИТ.

При тяжелых пневмониях в первую очередь необходимо провести бактериологическое исследование на пневмококк и другие бактериальные этиологические агенты с учетом спектра их чувствительности к антибиотикам, а также исключить легионеллезную этиологию с помощью экспресс-теста на определение антигена легионелл в моче пациентов. Во время подъема заболеваемости гриппом и ОРВИ достаточно высока вероятность тяжелых пневмоний вирусной или вирусно-бактериальной природы. В этом случае алгоритм диагностики тяжелых пневмоний должен учитывать возможность бактериальной, вирусной или вирусно-бактериальной этиологии. Недооценка на этапе лабораторной диагностики любого из вышеупомянутых этиологических вариантов тяжелых пневмоний у пациентов ОРИТ может привести к летальным исходам. Летальность при тяжелых ВП может составлять 25—50 %.

Термин «нетяжелая пневмония» используется для пневмоний, лечение которых проводится амбулаторно или в условиях стационара, но не требует госпитализации в ОРИТ. При отсутствии адекватной своевременной терапии нетяжелая пневмония может привести к серьезным осложнениям и хроническим заболеваниям бронхолегочной системы. Летальность при этом может составлять от 1 до 10 %. Наряду с бактериологическим исследованием на пневмококк и другие бактериальные этиологические агенты, с учетом спектра их чувствительности к антибиотикам, диагностика нетяжелых пневмоний должна учитывать возможность микоплазменной или хламидийной этиологии. Во время подъема заболеваемости гриппом и ОРВИ высока вероятность нетяжелых пневмоний вирусной, а также микст-инфекции упомянутых вирусов с бактериями, хламидиями или микоплазмами.

Требует расширенного анализа этиологической структуры ВП у пациентов с выраженными нарушениями иммунитета (синдром приобретенного иммунодефицита, прочие заболевания или патологические состояния). Помимо бактериологического исследования на пневмококк, другие бактериальные этиологические агенты, с учетом спектра их чувствительности к антибиотикам, и легионеллы для данной группы пациентов высока вероятность развития пневмонии, вызванной «оппортунистическими этиологическими агентами», прежде всего *Pneumocystis jiroveci*, а также цитомегаловирусом, грибами, вирусом герпеса. Дифференциальная диагностика с туберкулезом и другими микобактериозами является также важным и необходимым компонентом обследования пациентов с ВП, имеющими выраженные нарушениями иммунитета. Для

исключения легионеллезной этиологии пневмоний у иммунокомпрометированных больных проводится исследование бронхоальвеолярного лаважа или биопсии с помощью бактериологического метода, или ПЦР на *L. pneumophila* серогруппы 2—15 и *Legionella spp.*

При ВП у детей наиболее выражена полиэтиологичность, что необходимо учитывать в процессе лабораторной диагностики. Наряду с бактериологическим исследованием на пневмококк и другие бактериальные этиологические агенты, с учетом спектра их чувствительности к антибиотикам, диагностика пневмоний у детей должна учитывать широкий спектр респираторных вирусов, причем не только во время эпидемических подъемов заболеваемости гриппом и ОРВИ (вирусы гриппа, РС-вирус, метапневмовирус, вирусы парагриппа, аденовирусы, коронавирусы, бокавирус, риновирусы), а также этиологическую роль микоплазм и хламидий. При ВП у детей высока вероятность смешанной бактериально-вирусной инфекции, включая смешанную инфекцию с хламидиями и микоплазмами.

8. Контроль качества лабораторных исследований

Обязательным компонентом современной лабораторной диагностики является система качества лабораторных исследований и обеспечение ее функционирования. Система качества включает внутренний контроль на этапах лабораторного исследования и внешний контроль.

Внутренний контроль качества микробиологических исследований – комплекс выполняемых лабораторией мероприятий и процедур, направленных на предупреждение неблагоприятного воздействия факторов, возникающих в процессе подготовки, выполнения и оценки результатов анализа, способных повлиять на достоверность результата.

Внутренний контроль качества включает:

1. Контроль за соблюдением требований к условиям проведения анализа: (лабораторные помещения, воздушная среда, температурные режимы инкубации и хранения, режимы дезинфекции и стерилизации и т. д.).

2. Выполнение процедуры ведения эталонных бактериальных культур.

3. Контроль качества питательных сред.

4. Контроль качества тест-систем и реагентов.

5. Контроль качества дистиллированной воды.

Структура организации внутреннего контроля качества, периодичность и частота выполняемых процедур устанавливается действующей в

лаборатории системой менеджмента качества в соответствии с ГОСТ ИСО/МЭК 17025 и ГОСТ Р ИСО 15189.

Документальное оформление результатов проведенных контрольных процедур осуществляется по утвержденным действующей системой менеджмента качества формам. Регистрация и хранение контрольных результатов могут осуществляться на электронных носителях.

Обязательным разделом внутреннего контроля качества является проведение периодического, но не реже 1 раза в год, анализа результатов выполненных контрольных процедур, с учетом которого осуществляется корректировка руководства по качеству испытательной лаборатории.

Обеспечение внутреннего контроля качества молекулярно-генетических (ПЦР) исследований дополнительно проводят в соответствии с МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

Внешний контроль качества осуществляется в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025 и ГОСТ Р ИСО 15189 в форме участия в межлабораторных сравнительных испытаниях (МСИ) и/или программах проверки квалификации по показателям и с периодичностью в соответствии с установленными требованиями и потребностью лабораторий.

9. Требования безопасности

Исследования биологического (клинического) материала проводят в соответствии с действующими нормативными правовыми и методическими документами в отношении работы с микроорганизмами III—IV и I—II групп патогенности в зависимости от вида предполагаемого возбудителя.

Приложение

Правила получения биологического материала

С целью выяснения этиологического агента (агентов) инфекции нижних дыхательных путей при подозрении на ВП исследуется мокрота при глубоком откашливании, мокрота, полученная при индукции ингаляцией стерильного 5 %-го раствора натрия хлорида через небулайзер, мокрота, полученная аспирацией из трахеи с помощью хирургического вакуумного или электрического отсоса, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), получаемый с помощью фибробронхоскопии, а также кровь и плевральная жидкость.

В случае невозможности получения материала из нижних дыхательных путей при исследовании на респираторные вирусы, микоплазму и хламидию допустимо использование мазков из верхних дыхательных путей (из нижнего носового хода и с задней стенки глотки), которые берут у пациента как можно раньше от момента появления симптомов ОРЗ в одну пробирку и исследуют как один образец.

При подозрении на легионеллезную или паразитарную этиологию инфекции нижних дыхательных путей исследуются прижизненный БАЛ или биоптаты ткани легких.

У госпитализированных пациентов материал для исследования следует собирать как можно раньше при поступлении (не позднее вторых суток), поскольку в более поздние сроки не исключена возможность суперинфекции при контакте с другими пациентами. Сбор биологического материала для бактериологического исследования следует проводить до назначения антибиотиков.

В случае летального исхода исследуется посмертный (аутопсийный) материал.

Правила получения свободно отделяемой мокроты для бактериологического и ПЦР-исследования

Для сбора мокроты необходимо использовать стерильные герметично закрывающиеся пластиковые контейнеры. Перед сбором мокроты необходимо попросить пациента тщательно прополоскать рот кипяченой водой. Сбор мокроты осуществляется натощак или не ранее 2 ч после еды.

Пациента просят сделать несколько глубоких вдохов с задержкой дыхания на несколько секунд, затем с силой выдохнуть, что способствует появлению продуктивного кашля и очищению верхних дыхательных путей от мокроты. Затем пациента просят хорошо откашляться и со-

брать отделяемое из нижних дыхательных путей (не слюну!) в стерильный контейнер. Объем образца мокроты должен быть не менее 3 мл для взрослых и около 1 мл для детей.

До момента транспортирования образец вместе с направлением **на бактериологическое исследование** следует хранить в холодильнике при температуре 4—8 °С. Продолжительность хранения мокроты при комнатной температуре не должна превышать 2 ч.

Для **исследования методом ПЦР** допускается хранение образца мокроты в течение 1 суток при температуре от 2 до 8 °С, более длительно – при температуре не выше –16 °С.

Правила получения венозной крови
для бактериологического исследования

Для сбора крови с целью бактериологического исследования используются коммерческие герметично закрывающиеся стеклянные флаконы или флаконы из ударопрочного автоклавируемого пластика двух видов (содержащие питательную среду для выделения аэробов и анаэробов). Забор крови производится шприцем, кровь асептически переносится во флакон с транспортной средой непосредственно через резиновую пробку.

Забираются 2 образца венозной крови с интервалом 20—30 мин из различных периферических вен – например, левой и правой локтевой вены. Один образец помещается во флакон для выделения аэробов, другой для выделения анаэробов. Объем крови при каждой венепункции должен составлять не менее 10 мл для взрослых и 3 мл для детей.

Непосредственно перед венепункцией производится дезинфекция кожи в месте венепункции циркулярными движениями от центра к периферии дважды 70 %-м раствором спирта или 1—2 %-м раствором йода. Необходимо дождаться полного высыхания дезинфектанта, и провести манипуляцию, не касаясь места обработки кожи.

После венепункции следует удалить оставшийся йод с поверхности кожи, чтобы избежать ожога.

До момента транспортирования **с целью бактериологического исследования** образец вместе с направлением хранится при комнатной температуре (не более 2 ч) или в термостате.

Правила получения венозной крови для ПЦР-исследования

Взятие крови следует производить натощак или через 3 ч после приема пищи из локтевой вены в положении сидя. Взятие крови осуществляют в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА).

Непосредственно перед венепункцией производится дезинфекция кожи в месте венепункции циркулярными движениями от центра к периферии дважды 70 %-м раствором спирта или 1—2 %-м раствором йода. Необходимо дождаться полного высыхания дезинфектанта, и провести манипуляцию, не касаясь места обработки кожи. После венепункции следует удалить оставшийся йод с поверхности кожи, чтобы избежать ожога.

После взятия крови пробирку следует несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась. Пробирку поместить в штатив.

До момента транспортирования в лабораторию **с целью ПЦР-исследования** образец вместе с направлением хранится при температуре 20—25 °С в течение 6 ч с момента получения материала – для количественного определения нуклеиновых кислот, и в течение 12 ч – для качественного определения нуклеиновых кислот; при температуре 2—8 °С – не более одних суток для качественного и количественного определения ДНК/РНК инфекционных объектов. Замораживание образцов цельной крови недопустимо.

Правила получения плевральной жидкости для бактериологического и ПЦР-исследования

Взятие материала осуществлять в одноразовые, плотно завинчивающиеся пробирки объемом 10—15 мл.

Перед манипуляцией производится дезинфекция кожи 70 %-м этиловым спиртом, затем 1—2 %-м раствором йода, избыток йода удаляется марлевой салфеткой, смоченной 70 %-м спиртом во избежание ожога кожи пациента. После этого выполняется чрезкожная аспирация для получения пробы плевральной жидкости при тщательном соблюдении правил асептики. Объем пробы должен составлять не менее 5 мл. Из шприца удаляются все пузырьки воздуха, после чего проба немедленно переносится в стерильный пластиковый контейнер. Контейнер плотно закрывается крышкой.

До момента транспортирования образец вместе с направлением **на бактериологическое исследование** хранится в холодильнике при температуре 4—8 °С. Продолжительность хранения плевральной жидкости при комнатной температуре не должна превышать 2 ч.

Для исследования методом ПЦР допускается хранение образца в течение 1 суток при температуре от 2 до 8 °С, более длительно – при температуре не выше –16 °С.

Правила получения бронхоальвеолярного лаважа при подозрении на легионеллезную или паразитарную этиологию тяжелой ВП

Бронхоскопия выполняется в условиях оксигенотерапии (ингаляция кислорода через носовые катетеры, с помощью маски Вентури либо маски с резервуаром). Если не удается обеспечить достаточную оксигенацию крови, бронхоскопия выполняется в условиях неинвазивной вентиляции легких. У больных на искусственной вентиляции легких процедура выполняется под общей анестезией в условиях миоплегии через адаптер респиратора, снабженный клапаном для бронхоскопа. Бронхоальвеолярный лаваж проводят по принятым правилам. Фибробронхоскоп проводят в бронх до его заклинивания, после чего вводят подогретый до 37 °С 0,9 %-й раствор натрия хлорида с помощью одноразовых шприцев 8 порций по 20 мл (150—160 мл). С целью предотвращения коллапса альвеол отсасывание проводят при 50—80 мм рт. ст. Данная процедура позволяет получить необходимое количество альвеолярных макрофагов, в которых размножается возбудитель ВП.

Правила получения материала для паразитологического исследования

С целью выяснения этиологического агента (агентов) инфекции нижних дыхательных путей при подозрении на паразитарную этиологию исследуется прижизненный (биоптаты) и посмертный материал.

При жизни *легочную ткань* получают трансбронхиальной биопсией с помощью бронхоскопа, что позволяет выявить пневмоцисты в 66—98 %, однако этот метод забора материала показан далеко не всем больным. Получение материала для исследования возможно и при открытой биопсии легкого или с помощью чрезкожной интраторакальной аспирации легочной иглой у больных, которым противопоказано проведение трансбронхиальной биопсии при прогрессирующем течении заболевания. Метод открытой биопсии легкого дает наилучшие (100 %) результаты и приравнивается по результату к хирургическому вмешательству, при этом получается достаточно большой объем материала для исследования и ложноотрицательный результат полностью исключается.

В настоящее время в клиниках стали активно исследовать *бронхоальвеолярный лаваж* для выявления цист и трофозоитов.

Посмертный материал собирают в течение первых суток после гибели больного, приготавливают мазки-отпечатки легкого или мазки из пенистого содержимого альвеол.

Правила получения трахеального аспирата для ПЦР-исследования

Манипуляцию проводят натощак после чистки зубов и полоскания полости рта водой. Пациента просят сделать несколько глубоких вдохов с задержкой дыхания на несколько секунд, затем с силой выдохнуть. Это способствует появлению продуктивного кашля и очищению верхних дыхательных путей от мокроты. После присоединения мукус-экстрактора через трубку-переходник к отсосу катетер для забора трахеального аспирата вводился в глотку через полость рта. Вследствие раздражения слизистой в области голосовой щели провоцируется кашлевой рефлекс и проводится извлечение трахеального содержимого через стерильный катетер (6-го или 7-го размера) с помощью отсоса. Объем трахеального аспирата должен составлять не менее 3—5 мл.

Правила получения индуцированной мокроты для бактериологического и ПЦР-исследования

Перед процедурой пациенты получают сальбутамол (дети – 200 мкг) через дозирующий ингалятор для предотвращения бронхоспазма. Затем в течение 15 мин через струйный небулайзер (аэрозольный аппарат) подается кислород со скоростью 5 л/мин с 5 мл 5 %-го стерильного раствора NaCl. После этого проводится постукивание по передней и задней стенкам грудной клетки с целью стимуляции отхождения мокроты.

Затем пациента просят хорошо откашляться и собрать отделяемое из нижних дыхательных путей (не слюну!) в стерильный контейнер. Объем образца мокроты должен быть не менее 3 мл для взрослых и около 1 мл для детей.

В случае если мокрота не откашливается, процедуру рекомендуется комбинировать с последующим получением аспиратов из трахеи с целью отсасывания содержимого из трахеи с помощью стандартного отсоса с использованием стерильного катетера 6-го или 7-го размера.

До момента транспортирования образец вместе с направлением **на бактериологическое исследование** хранится в холодильнике при температуре 4—8 °С. Продолжительность хранения мокроты при комнатной температуре не должна превышать 2 ч.

Для исследования методом ПЦР допускается хранение в течение 1 суток при температуре от 2 до 8 °С, более длительно – при температуре не выше –16 °С.

Правила получения мазков из верхних дыхательных путей для ПЦР-исследования

Материал берут после полоскания полости рта кипяченой водой комнатной температуры. Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. В течение 6 ч перед процедурой нельзя использовать медикаменты, орошающие носоглотку или ротоглотку и препараты для рассасывания во рту.

Мазки у пациента берут двумя разными зондами сначала со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом концы зондов с тампонами после взятия мазков последовательно помещаются в одну пробирку объемом 1,5—2,0 мл с 0,5 мл транспортной среды.

Мазки со слизистой носоглотки у детей берут сухим стерильным назофарингеальным велюр-тампоном на пластиковом аппликаторе. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2—3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (3—4 см для детей и 5—6 см для взрослых). После забора материала конец зонда с тампоном опускают в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой до места слома, при этом гибкая часть зонда сворачивается спиралью, далее, прикрывая сверху пробирку крышкой, рукоятку зонда опускают вниз, добиваясь полного отламывания верхней части зонда. Пробирку герметично закрывают.

Мазки со слизистой носоглотки у взрослых допустимо брать также сухим стерильным зондом из полистирола с вискозным тампоном. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2—3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (5 см для взрослых). После забора материала конец зонда с тампоном опускают на глубину 1 см в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой и отламывают, придерживая крышкой пробирки. Пробирку герметично закрывают.

Мазки из ротоглотки берут сухим стерильным зондом из полистирола с вискозным тампоном вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки, аккуратно прижимая язык пациента шпателем. После забора материала рабочую часть зонда с тампоном помещают в стерильную одноразовую пробирку

с транспортной средой и зондом с мазком из носоглотки. Конец зонда с тампоном (1 см) отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Допускается хранение в течение трех суток при температуре 2—8 °С, более длительно – при температуре не выше –16 °С.

Правила получения материала для серологической диагностики (Выявление специфических антител)

Для серологического исследования (определение антител) необходимы две пробы сыворотки крови, 1-я проба берется в день постановки первичного диагноза, 2-я проба – через 2—3 недели после первой. Взятие крови осуществляется из вены в объеме 3—4 мл, или из третьей фаланги среднего пальца в объеме 0,5—1,0 мл в одноразовую пластиковую пробирку без антикоагулянта. Пробы крови отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин или помещают в термостат при 37 °С на 15 мин. После центрифугирования (10 мин при 3 000 об./мин) сыворотку переносят в стерильные пробирки, используя для каждого образца отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Срок хранения цельной крови – не более 6 ч, замораживание недопустимо. Срок хранения сыворотки крови при комнатной температуре – в течение 6 ч, при температуре 2—8 °С – в течение 5 суток, более длительно – при температуре не выше –16 °С (многократное замораживание/размораживание недопустимо).

Правила получения аутопсийного материала для ПЦР-исследования

Посмертный материал собирают в течение первых суток после гибели больного стерильным индивидуальным инструментом (индивидуально для каждого органа) из зоны поврежденной ткани объемом 1—3 $см^3$, помещают в одноразовые стерильные пластиковые контейнеры с герметично завинчивающейся крышкой, замораживают и хранят при температуре не выше –16 °С.

Правила получения и транспортирования мочи для определения антигена легионелл или пневмококка

Образцы мочи для исследования объемом 5—10 мл помещают в стандартные пластиковые контейнеры и хранят при комнатной температуре (15—30 °С) не более 24 ч после забора перед постановкой реакции. В случае необходимости образцы могут храниться при температуре 2—8 °С до 14 дней или при –20 °С в течение длительного времени для первичного или повторного исследования. В качестве консерванта может

быть использована борная кислота. Перед постановкой реакции охлажденные или замороженные образцы мочи исследуют на наличие антигена после достижения комнатной температуры.

Требования к маркировке материала для лабораторного исследования

На этикетке пробирок (контейнеров) с материалом указывается: фамилия и имя обследуемого, дата взятия материала, тип материала.

В сопроводительном документе (направлении) к материалу, собранному для исследования в лаборатории, необходимо указать:

- наименование учреждения, которое направляет материал на исследования, и телефон;
- фамилию и имя обследуемого больного;
- возраст;
- дату заболевания или контакта с больным;
- предполагаемый диагноз, тяжесть заболевания или повод к обследованию;
- степень тяжести заболевания;
- данные о вакцинации против гриппа в текущем эпидемическом сезоне (вакцинирован / не вакцинирован / нет данных);
- дату и подпись медицинского лица.

Транспортирование материала производится в термоконтейнерах при рекомендованной для хранения температуре. Образцы от каждого пациента дополнительно упаковываются в индивидуальный герметичный пакет с адсорбирующим материалом.

Обработка биологического материала перед проведением лабораторных исследований

В лаборатории перед началом проведения ПЦР-исследований биологического материала вязкой консистенции (мокрота, аспираты из трахеи) необходима его предобработка с целью снижения вязкости, например с помощью препарата типа «Муколизин», согласно инструкции. Аутопсийный материал подвергается гомогенизации с последующим приготовлением 20 %-й суспензии с использованием буферного раствора (физиологического раствора натрия хлорида или фосфатного буфера).

Список литературы

1. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике: Пособие для врачей /А. Г. Чучалин, А. И. Синопальников с соавт. М., 2010. 106 с.

2. Пневмония /А. Г. Чучалин, А. И. Синопальников, Л. С. Страчунский. М., 2006.

3. Стандарт специализированной медицинской помощи при пневмонии тяжелой степени тяжести с осложнениями: Приложение к приказу Минздрава России от 29.01.2013 № 741н.

4. Козлов Р. С. Пневмококки: уроки прошлого – взгляд в будущее. Смоленск, 2010.

5. СП 3.1.2.2626—10 «Профилактика легионеллеза».

6. СП 3.1.7.2811—10 «Профилактика коксиеллеза (лихорадка Ку)».

7. СП 3.1.7.2642—10 «Профилактика туляремии».

8. СП 3.1.7.2815—10 «Профилактика орнитоза».

9. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

10. МУ 3.1.2.3047—13 «Эпидемиологический надзор за внебольничными пневмониями».

11. МУ 4.2.2039—05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 23.12.2005).

12. Методические указания МЗ РФ № 99/168 «Организация выявления больных туберкулезом с применением лучевых, клинических и микробиологических методов». 2000.

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. МУ 2.1.4.1057—01 «Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды».

15. МР № 01/14633-8-34 «Выявление антигена бактерий *Legionella pneumophila* серогруппы 1 в клиническом материале иммунохроматографическим методом» (утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 9.12.2008).

16. МУК 4.2.1890—04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 4.03.2004).

Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний

Методические указания
МУК 4.2.3115—13

Редактор Л. С. Кучурова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 15.01.14

Формат 60x88/16 Печ. л. 2,5
Тираж 200 экз. Заказ 3

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 8(495)952-50-89

gost.e-ecolog.ru