

# НАУКОВЕ ОБГРУНТУВАННЯ ТА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ АЛГОРИТМУ ЕТІОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ НЕГОСПІТАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЙ НИЖНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

Я. О. Дзюблик

ДУ «Національний інститут фізіотерпії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України», Київ

**Резюме.** З метою розробки алгоритму етіологічної діагностики негоспітальних інфекцій нижніх дихальних шляхів та оцінки його ефективності було обстежено 508 хворих на негоспітальну пневмонію та 165 хворих із інфекційним загостренням хронічного обструктивного захворювання легень. Отримані дані було покладено в основу побудови нового діагностичного алгоритму, який полягає у одночасному використанні класичного бактеріологічного, молекулярно-генетичного та серологічного підходів до етіологічної діагностики. Встановлено, що клінічне використання запропонованого алгоритму значно збільшує частоту ідентифікації патогенів. Даний алгоритм рекомендований для використання в практиці охорони здоров'я.  
**Ключові слова:** негоспітальна пневмонія, ХОЗЛ, діагностика, алгоритм.

## НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЛГОРИТМА ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Я. А. Дзюблик

**Резюме.** С целью разработки алгоритма этиологической диагностики внебольничных инфекций нижних дыхательных путей и оценки его эффективности обследовано 508 больных внебольничной пневмонией и 165 больных с инфекционным обострением хронического обструктивного заболевания легких. Полученные данные были положены в основу построения нового диагностического алгоритма, который состоит в одновременном использовании классического бактериологического, молекулярно-генетического и серологического подходов к этиологической диагностике. Было установлено, что клиническое использование предложенного алгоритма значительно повышает частоту идентификации патогенов. Данный алгоритм рекомендован для использования в практике здравоохранения.  
**Ключевые слова:** внебольничная пневмония, ХОЗЛ, диагностика, алгоритм.

## SCIENTIFIC RATIONALE AND EFFECTIVENESS OF NOVEL ALGORITHM FOR DIAGNOSTICS OF LOW RESPIRATORY TRACT COMMUNITY-ACQUIRED INFECTIONS

Ya. O. Dziublyk

**Summary.** In order to develop an algorithm for diagnostics of low respiratory tract community-acquired infections we examined 508 community-acquired pneumonia patients and 165 patients with infectious exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. The results of examination were used to develop a novel diagnostic algorithm, which incorporated simultaneous use of classic bacteriological, molecular-genetic and serological approaches. It was proved that clinical use of this algorithm significantly increased the rate of identification of pathogens. Current algorithm is indicted for use in healthcare facilities.  
**Key words:** community-acquired pneumonia, COPD, diagnostics, algorithm.

Адреса для листування:

Дзюблик Ярослав Олександрович

ДУ «Національний інститут фізіотерпії і пульмонології  
ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»  
10, вул. М. Амосова, Київ, 03680

Негоспітальні інфекції нижніх дихальних шляхів (НІНДШ), основними представниками яких є негоспітальна пневмонія (НП) та інфекційне загострення хронічного обструктивного захворювання легень (ІЗ ХОЗЛ), незважаючи на новітні досягнення антимікробної хіміотерапії й досі залишаються складною проблемою сучасної медицини [1, 2]. Запорукою ефективної терапії цих захворювань є визначення етіологічного чинника, проте традиційні бактеріологічні методи досліджень, які застосовують в практичній медицині, дозволяють ідентифікувати патоген не більше ніж в 50 % випадків [3]. Впровадження нових

високотехнологічних методів діагностики, таких як молекулярно-біологічні тести на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), дає можливість підвищити інформативність обстеження та ідентифікувати збудників бактеріальної та вірусної природи [4]. До того ж все частіше в лабораторній практиці для виявлення у матеріалі хворого бактеріальних і вірусних антигенів використовують швидкі тести на основі імунохроматографічного аналізу (ІХА), які не потребують коштовного обладнання та високої кваліфікації лабораторного персоналу [5]. Нерозв'язаним залишається питання систематизації та оптимізації

спільного використання як традиційних, так і нових діагностичних підходів. Тому одним із основних завдань наукових розробок стає необхідність створення ефективного алгоритму діагностики НІНДШ, який би регламентував перелік і послідовність виконання лабораторних досліджень [6].

Метою роботи була розробка алгоритму етіологічної діагностики НІНДШ з використанням сучасних бактеріологічних, імунологічних і молекулярно-генетичних методів дослідження та оцінка його ефективності.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Обстежили 673 пацієнтів із НІНДШ. З них у 508 хворих діагностували НП, а у 165 – ІЗ ХОЗЛ. Діагноз НП встановлювали на основі вимог наказу № 128 МОЗ України від 19.03.2007 [7]. Діагноз ХОЗЛ верифікували з урахуванням рекомендацій міжнародної робочої групи GOLD у поточній редакції [8], наявність інфекційного загострення – за критеріями N. Antonisen та співавторів [9]. Матеріалом для проведення лабораторних досліджень слугували мокрота, мазки з носоглотки, сеча та кров. Бактеріологічний метод включав в себе бактеріоскопію пофарбованих за Грамом мазків мокроти та посів матеріалу на поживні середовища (у хворих із тяжким перебігом також проводили посіви крові). Для експрес-діагностики *S. pneumoniae* та *L. pneumophila* (1-й серотип) використовували швидкі тести (відповідно «Streptococcus pneumoniae Antigen Test Kit» та «Legionella Urinary Antigen Test Kit NOW» фірми «Alere Scarborough, Inc.», США). Матеріалом для дослідження слугувала сеча. Результат дослідження враховували через 5–15 хв. Крім того, застосовували швидкі тести й для ідентифікації вірусів грипу А і В, респіраторних аденовірусів та РС-вірусу. «Cito Test Influenza A&B» використовували для якісного визначення нуклеопротеїнів всіх відомих субтипів та штамів вірусів грипу А і В, в тому числі високопатогенного пандемічного вірусу грипу А( $H_1N_1$ -swn). Для діагностики аденовірусної інфекції застосовували «Cito Test ADENO RESPI». Швидкий тест «Cito Test RSV Blister» використовували для діагностики РС-інфекції А/В та диференційної діагностики з іншими респіраторними вірусами. Матеріалом для дослідження слугували мазок з носу або носоглоткові змиви. Процедура тестування на РС-віруси включала в себе такі ж самі етапи, як і при дослідженні на грип. Результат тестування обліковували візуально через 10–15 хв після нанесення зразка.

Молекулярно-генетичні методи (ПЛР у реальному часі) були використані для діагностики атипичних бактеріальних патогенів та респіраторних вірусів. За допомогою наборів «Seeplex RV12 ACE Detection» проводили мультиплексну ПЛР для одночасного визначення фрагментів нуклеїнових кислот наступних вірусів: *Human adenovirus*, *Influenza virus A*, *Influenza virus B*, *Human respiratory syncytial virus*, *Human respiratory syncytial virus B*, *Human metapneumovirus*, *Human parainfluenza virus 1*, *Human parainfluenza virus 2*, *Human parainfluenza virus*, *Human rhinovirus A/B*, *Human coronavirus 229E/NL63*,

*Human coronavirus OC43/HKU1*. Також позитивні зразки на вірус грипу А відбирали для ампліфікації комерційними наборами «Seeplex FluA ACE Subtyping» для визначення найбільш поширених субтипів збудника: пандемічного вірусу грипу А ( $H_1N_1$ -свинячий), сезонного вірусу грипу А ( $H_1N_1$ ) людини, сезонного вірусу грипу людини А ( $H_3N_2$ ) та пташиного вірусу грипу А ( $H_5N_3$ ).

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За даними бактеріоскопії біологічні зразки від хворих на НП виявились інформативними у 83,7 % випадків. Був виконаний посів мокроти на поживні середовища усіх цих пацієнтів, що дало змогу виявити в діагностично значущих концентраціях 137 (46,8 %) штамів бактеріальних етіопатогенів. Основним проблемним збудником НП у обстежених хворих виступав *S. pneumoniae*. Він був ідентифікований у (40,9 ± 5,2) % випадків. Друге місце за частотою займала *H. influenzae*, яка призвела до виникнення захворювання у (15,3 ± 6,1) % хворих. Також у (4,4 ± 2,8) % хворих виявляли *M. catarrhalis*; у (13,9 ± 4,8) % – *S. aureus* та у (13,9 ± 4,8) % – *K. pneumoniae*. *E. coli* спричинила НП у (11,6 ± 5,6) % пацієнтів.

Наявність атипичних збудників (*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*) у біологічному матеріалі визначали за допомогою ПЛР у реальному часі. Всього обстежили 54 хворих на НП. У жодному випадку атипичні збудники виявлені не були.

Швидкий тест на наявність у сечі антигену *S. pneumoniae* використали для обстеження 32 хворих на НП, дані якого співставили з результатами посіву мокроти на поживне середовище. Цей тест виявився позитивним у 34,6 % випадків, а його співставність із бактеріологічним методом склала 84,6 %.

За допомогою швидкого тесту на наявність у сечі антигену *L. pneumophila* (1-й серотип) обстежили 48 хворих на НП і співставляли його результати з такими ПЛР. В усіх випадках дані тесту, також як і ПЛР, були негативними.

Бактеріологічне дослідження мокроти або змивів із бронхів провели у 165 хворих із ІЗ ХОЗЛ. За даними бактеріоскопії, біологічні зразки виявились інформативними у 138 (83,6 %) випадках. Посів мокроти або змивів із бронхів на поживні середовища дав змогу ідентифікувати у 92 (66,7 %) пацієнтів із позитивним результатом бактеріоскопічного дослідження 103 штами бактеріальних збудників у діагностично значущій концентрації. Основним проблемним етіопатогеном ІЗ у хворих на ХОЗЛ була *H. influenzae*, яку визначили у (46,6 ± 4,9) % пацієнтів. Усі інші мікроорганізми зустрічались значно рідше: *S. pneumoniae* – у (20,4 ± 4,0) % випадків, *K. pneumoniae* – у (13,6 ± 3,4) %, *M. catarrhalis* – у (0,9 ± 0,8) %, *E. coli* – у (10,7 ± 3,0) %, *S. aureus* – у (4,9 ± 2,1) % та *P. aeruginosa* – у (2,9 ± 1,6) %. У 11 ((10,7 ± 3,0) %) пацієнтів виявили асоціацію збудників: *H. influenzae* з *K. pneumoniae* – у 3 хворих, *H. influenzae* з *S. aureus* – у 1, *S. pneumoniae* з *E. coli* – у 3, *P. aeruginosa* з *S. pneumoniae* – у 1 та *H. influenzae* з атипичними патогенами (*M. pneumoniae* або *C. pneumoniae*) – у решти пацієнтів.

У 18 хворих на ХОЗЛ співставили дані швидкого тесту на наявність у сечі антигену *S. pneumoniae* із результатами посіву мокроти на поживне середовище. Тест виявився позитивним у 27,8 % випадків, при цьому співставність із бактеріологічним методом склала 80,0 %.

Вірусологічне обстеження було проведено 112 хворих на НП, що виникла після перенесених гострих респіраторних вірусних інфекцій (ГРВІ) та грипу. Респіраторні віруси за допомогою ПЛР були ідентифіковані у 95 носоглоткових змивах (84,8 %), в тому числі вірусна моноінфекція була встановлена у 74,8 % випадків та мікст-інфекція за участі двох вірусів — у 10 %. Вірус грипу А, особливо його пандемічний варіант, як правило, зустрічався у вигляді моноінфекції. Спостерігали мікст-інфекцію РС-вірус/риновірус. Метапневмовірус та бокавірус першого типу не виявили в жодному із зразків.

Геномна РНК вірусу грипу А була ідентифікована у 30,3 % випадків (34 пацієнти), в тому числі РНК високопатогенного вірусу грипу людини А (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) California — у 20 %. РНК вірусу грипу В не виявили.

Геномна нуклеїнова кислота риновірусу (*Rhinovirus* А/В) була ідентифікована у 1,7 % випадків, респіраторного коронавірусу (*Coronavirus* 229Е) — у 7,1 %, РС-вірусу А (*Respiratory syncytial virus* А) — у 8,0 %, парагрипу 2 (*Parainfluenza virus* 2) — у 10,0 %, парагрипів 1 і 3 (*Parainfluenza virus* 1, 3) — кожен у 8,9 %, аденовірусу (*Adenovirus*) — у 4,5 %, РС-вірусу В (*Respiratory syncytial virus* В) — у 3,5 %, коронавірусу (*Coronavirus* OC43) — майже у 1,0 %.

Таким чином, за допомогою молекулярно-біологічних технологій, зокрема методами ПЛР та ПЛР із зворотною транскрипцією, які ми застосовували в мультиплексному та моноплексному форматі, у хворих на НП були виявлені наступні збудники: вірус грипу А сезонний та високопатогенний штам А (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) California (у 30,3 % випадків), парагрипу 2 (у 10 %), парагрипу 1 та 3 типу (кожен у 8,9 %), *Respiratory syncytial virus* А та *Coronavirus* у 8,1 %.

Важливо підкреслити, що використання мультиплексної ПЛР для виявлення 12 респіраторних вірусів дозволило, крім добре відомих респіраторних вірусів, ідентифікувати ще і 9 штамів нових вірусів, що не виявляються класичними вірусологічними методами. Крім того, застосування мультиплексної ПЛР для встановлення найбільш поширених субтипів вірусу грипу А, дало можливість додатково виявити та ідентифікувати субтип високопатогенного пандемічного вірусу грипу А (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>-swn). В цілому, завдяки методам ампліфікації нуклеїнових кислот було додатково визначено 29 штамів нових респіраторних вірусів.

З використанням швидких тестів дослідили 112 клінічних зразків, отриманих від хворих на НП та виявили маркери вірусної інфекції, а саме антигени вірусів грипу А (у 34 зразках), респіраторних аденовірусів (у 5) та РС-вірусів (у 13). Всього позитивними на наявність антигенів респіраторних вірусів були 52 (46,4 %) зразки носоглоткових змивів. Антигенів вірусу грипу В не виявили.

Наявність респіраторних вірусів в етіологічній структурі інфекційних загострень у хворих на ХОЗЛ була підтверджена за допомогою молекулярно-біологічних методів у 28,8 % випадків. Вірус грипу А (сезонний) зустрічався у вигляді моноінфекції у 5 (9,6%) хворих, респіраторний коронавірус і вірус парагрипу 2 — у 4 (7,7 %). У 2 пацієнтів ідентифікували риновірус, а у 1 — мікст-інфекцію вірус парагрипу/риновірус. Респіраторних аденовірусів та РС-вірусу не виявили.

На основі результатів проведеного дослідження нами був побудований алгоритм етіологічної діагностики НІНДШ, який включав в себе наступне (рисунок):

- отриманий від хворого біологічний матеріал — мазки або змиви з носоглотки, мокрота, бронхоальвеолярні змиви, сеча та кров, необхідно відправляти в бактеріологічну та вірусологічну лабораторії для проведення бактеріологічного та молекулярно-біологічного дослідження. Тестування з використанням швидких тестів може здійснюватися в приймальному відділенні, біля ліжка хворого, в маніпуляційному кабінеті або також в умовах лабораторії. Матеріал від хворого бажано отримати до початку курсу етіотропної терапії;
- бактеріологічний метод повинен включати в себе бактеріоскопію пофарбованих за Грамом мазків мокроти та посів цього матеріалу (при його інформативності) на поживні середовища (при тяжкому перебігу захворювання також необхідно проводити посів крові);
- молекулярно-біологічні методи (мультиплексна ПЛР у реальному часі) слід застосовувати для діагностики атипичних бактеріальних збудників та респіраторних вірусів. Позитивні зразки на вірус грипу А необхідно відбирати для подальшого визначення його субтипів: пандемічного вірусу грипу А (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>-свинячий), сезонного вірусу грипу А (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) людини, сезонного вірусу грипу людини А (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) та пташиного вірусу грипу А (H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>).
- експрес-тестування «біля ліжка хворого», впродовж 10–15 хв, слід проводити із застосуванням сучасних зареєстрованих в Україні швидких тестів, які дозволяють ідентифікувати *S. pneumoniae*, *L. pneumophila*, вірус грипу А і В, респіраторний аденовірус та РС-вірус.

Одночасне використання трьох різних методичних підходів (класичний бактеріологічний, швидкі тести та ПЛР) для детекції респіраторних збудників є ефективним і покращує етіологічну діагностику НІНДШ. Крім того, включення в алгоритм високотехнологічної мультиплексної ПЛР та комерційних систем для виявлення 6–12 і більше респіраторних вірусів надає можливість отримати важливу інформацію стосовно наявності моно- і ко-інфекцій (вірусно-вірусних, вірусно-бактеріальних) впродовж (6–12 год). У ряді випадків при застосуванні тільки швидких тестів можливо отримати етіологічний діагноз через 10–15 хв.

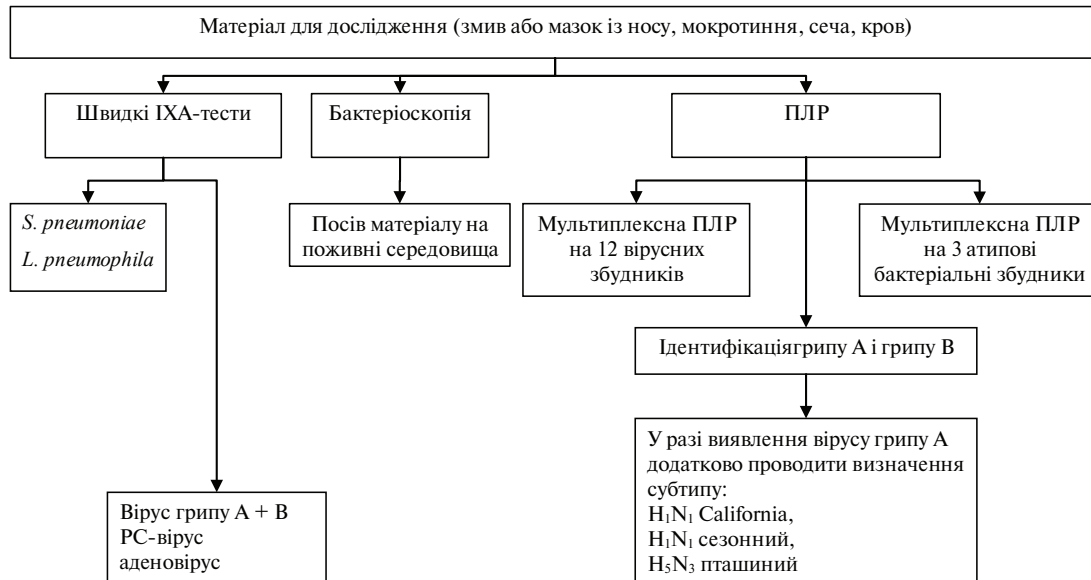


Рисунок – Алгоритм етіологічної діагностики НІНДШ

Даний алгоритм дозволяє встановити етіологію НІНДШ у 84,9 % хворих, що на 31,5 % вище, ніж при застосуванні традиційних підходів ( $p < 0,05$ ).

**ВИСНОВКИ**

Запропонований алгоритм значно підвищує ефективність етіологічної діагностики НІНДШ. Він рекомендований до використання в першу чергу у стаціонарних хворих, особливо із тяжким перебігом захворювання. Крім того, алгоритм забезпечує реалізацію трьох стратегій застосування молекулярно-біологічних методів, швидких ІХА-тестів та їх комбінації для виявлення випадків ко-інфекування, нових респіраторних вірусів і атипівних бактеріальних збудників у термін від 15 хв до 12 год.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Фещенко, Ю. И. Рациональная антибиотикотерапия больных с инфекциями нижних дыхательных путей [Текст] / Ю. И. Фещенко, А. Я. Дзюблик // Укр. пульмонолог. журн. – 2009, № 4. – С. 5–8.
2. Синопальников, А. И. Внебольничные инфекции дыхательных путей [Текст] / А. И. Синопальников, Р. С. Козлов. – Москва: Премьер-МТ, 2007. – 354 с.

3. Рачина, С. А. Современные подходы к микробиологической диагностике при внебольничной пневмонии [Текст] / С. А. Рачина, Р. С. Козлов // Пульмонология. – 2010. – № 1. – С. 5–14.
4. Дзюблик, О. Я. Спектр вірусних збудників у хворих на негоспітальну пневмонію [Текст] / О. Я. Дзюблик, І. В. Дзюблик, Р. Є. Сухін [та ін.] // Укр. пульмонолог. журн. – 2010. – № 1. – С. 27–30.
5. Can an etiologic agent be identified in adults who are hospitalized for community-acquired pneumonia: results of a one-year study [Text] / D. M. Musher [et al.] – J. Infect. – 2013. – Vol. 67, Suppl. 1. – P. 11–18.
6. Чучалин, А. Г. Актуальные вопросы диагноза в пульмонологии [Текст] / А. Г. Чучалин // Пульмонология. – 2001. – № 1. – С. 6–11.
7. Міністерство охорони здоров'я України. Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Пульмонологія». Наказ № 128 від 19.03.2007 р. – К.: Велес. – 2007. – 146 с.
8. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (revised 2011). [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.goldcopd.org>.
9. Antonisen, N. R. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [Text] / N. R. Antonisen, J. Manfreda, C. P. Warren // Ann. Intern. Med. – 1987. – Vol. 106, Suppl. 2. – P. 196–204.