

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Матеріали і методи дослідження

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

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

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

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

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

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

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

Усі хворі дали письмову згоду на проведення досліджень.

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

#### Результати та їх обговорення

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

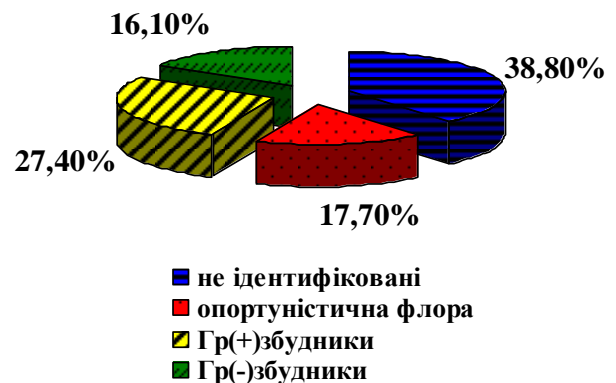


Рис. 1. Структура ідентифікованих збудників у хворих на ТНП

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

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

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

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

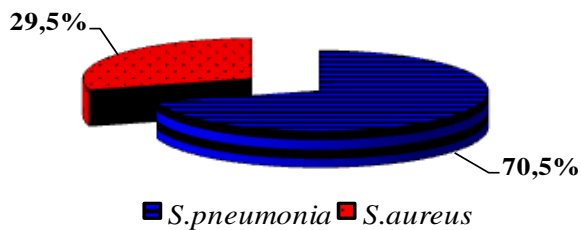


Рис. 2. Структура ідентифікованих збудників у хворих на ТНП підгрупи А

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

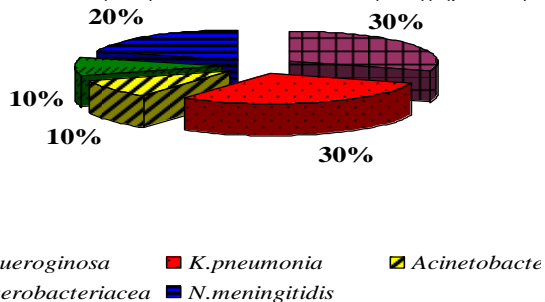


Рис. 3. Структура ідентифікованих збудників у хворих на ТНП підгрупи В

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

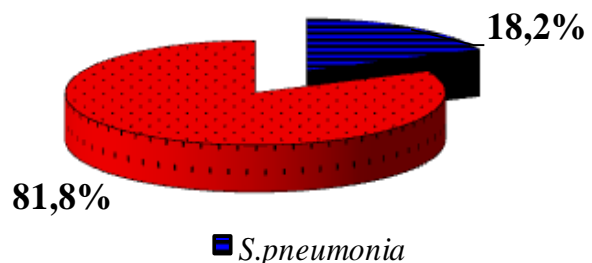


Рис. 4. Структура ідентифікованих збудників у хворих групи 2

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

### Висновки

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

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

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

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

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

### Література

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

ческое пособие / Т. А. Перцева [и др.]. – Киев, 2012. – 69 с.

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