

## ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ

Н.Ф. Бруснигина, В.Н. Мазепа, Л.П. Самохина, О.М. Черневская, К.А. Орлова, Е.В. Сперанская,

Л.Е. Скобло, Н.Н. Клемина, Н.Н. Барышева, ФГУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора»

*Бруснигина Нина Федоровна – раб. тел.: (831) 432-87-91.*

В работе представлены результаты комплексного ПЦР обследования 172 больных внебольничной пневмонией различной степени тяжести. В 88,5% случаев установлена этиология внебольничной пневмонии. Ведущими возбудителями оказались *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*, которые были выявлены в 86,3% и 41,2% случаев соответственно. В число актуальных возбудителей внебольничной пневмонии вошли *Mycoplasma pneumoniae* (23,6%), *Adenovirus* (14,9%). *Chlamydomphila pneumoniae* обнаруживается значительно реже (6,7%). Характерной особенностью внебольничных пневмоний на современном этапе является наличие большого числа ассоциаций микроорганизмов, как бактерий, так и вирусов. Роль *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila psittaci* в этиологии внебольничных пневмоний незначительна. Предложен алгоритм детекции атипичных труднокультивируемых микроорганизмов методом ПЦР минибулов, позволяющий повысить эффективность их обнаружения.

**Ключевые слова:** внебольничные пневмонии, инфекционно-воспалительный процесс, пневмококковая инфекция, устойчивость, метод полимеразной цепной реакции, амплификаторы.

The results of complex PCR examination of 172 patients with community-acquired pneumonia of varying severity are presented in the article. In 88,5% cases etiology of community-acquired pneumonia was proved. The main causative agents appeared to be *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* which were detected in 86,3% and 41,2% cases accordingly. The number of actual causative agents of community-acquired pneumonia included *Mycoplasma pneumoniae* (23,6%), *Adenovirus* (14,9%) and more seldom *Chlamydomphila pneumoniae* (6,7%). Specific characteristic of community-acquired pneumonia at the present stage is presence of a great number of association microbes – both bacteria and viruses. The role of *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila psittaci* in etiology of community-acquired pneumonia is insignificant. The authors offer algorithm for detection of atypical microbes poor-cultivated with PCR-method, which allows to increase efficiency of their detection.

**Key words:** community-acquired pneumonia, infective-inflammatory process, pneumonical infection, persistence, PCR-method, amplifies.

Внебольничные пневмонии составляют большинство пневмоний и относятся к группе заболеваний нижних отделов дыхательных путей. По современным представлениям внебольничная пневмония – острый инфекционно-воспалительный процесс в легких, приобретенный вне лечебного учреждения. Согласно официальной статистике в Российской Федерации общее число больных пневмонией ежегодно превышает 1,5 миллиона, каждый год от пневмонии погибает более 40 тысяч человек, при этом наиболее высокая смертность регистрируется у мужчин трудоспособного возраста. В целом, пневмония занимает шестое место среди всех причин смертности и составляет 2-3%, достигая 5% в ряде регионов [1, 2, 3]. Несмотря на широкий арсенал антибактериальных средств, клиническая практика свидетельствует, что назначение антибиотиков не является абсолютной гарантией успешного лечения.

Современные отечественные и международные руководства по лечению пневмоний подчеркивают необходимость установления этиологического диагноза для обоснования этиотропной терапии, что существенно повышает требования к уровню лабораторного обследования больных. В настоящее время сохраняется мнение о доминирующей роли пневмококка в этиологии внебольничной пневмонии. Однако в последние годы на фоне снижения иммунного статуса населения возрас-

тает эпидемиологическая значимость ранее малоизвестных трудно культивируемых возбудителей пневмонии, таких как легионеллы, микоплазмы, хламидии, которые характеризуются своеобразным спектром чувствительности к антибиотикам. Ряд исследователей отмечают частое наличие смешанного инфицирования при пневмониях, когда пневмококковая инфекция ассоциируется с гемофильной, хламидийной, микоплазменной, легионеллезной или вирусными инфекциями [4, 5]. При проведении лабораторных исследований, как правило, используют комплекс методов – бактериологических, культуральных, иммунологических, серологических. Большинство атипичных возбудителей данными методами детектируются недостаточно надежно, так как являются трудно культивируемыми организмами с высокой антигенной изменчивостью. Трудности, связанные с расшифровкой этиологической структуры внебольничных пневмоний, в значительной степени определяются отсутствием универсального, информативного субстрата для исследования, и при выявлении инфекционных агентов приходится проводить анализ различных биологических проб: слюны, мокроты, мазков из зева, бронхоальвеолярного лаважа, плевральной жидкости, биопсийного материала из органов дыхательной системы. При этом ни один из субстратов не является предпочтительным для детекции большинства возбудителей внебольничной пневмонии.

Многие авторы указывают, что даже при тщательном бактериологическом, вирусологическом и серологическом обследовании до 50% случаев пневмоний остаются этиологически нерасшифрованными [6].

В последние годы за рубежом и в Российской Федерации в этиологической диагностике воспалительных заболеваний респираторного тракта широко используются молекулярно-биологические методы, главным образом, различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР) [7, 8, 9, 10, 11]. ПЦР-анализ, основанный на амплификации специфических фрагментов генома микроорганизмов, характеризуется высокой чувствительностью (100-1000 клеток или вирионов), экспрессностью (получение результата в течение 6-8 часов), прецизионной специфичностью (до 100%). В настоящее время в Российской Федерации разработаны, сертифицированы и производятся ПЦР-диагностикумы для выявления более 90 возбудителей инфекционных заболеваний. ПЦР является ценным диагностическим инструментом, позволяющим выявлять инфекционные агенты в любом биологическом субстрате, совершенствующим диагностику как острых, так и хронических заболеваний органов дыхания. Его использование в клинической практике одобрено и рекомендовано рядом нормативных документов [12, 13, 14].

**Целью работы** являлось изучение этиологической структуры внебольничной пневмонии с использованием метода ПЦР.

**Материалы и методы.** Были обследованы 172 пациента, находящихся на стационарном лечении, с рентгенологически и клинически подтвержденным диагнозом «внебольничная пневмония» различной степени тяжести. Материалом для исследования служили различные биологические субстраты: слюна, мокрота, мазки носоглотки, лаваж (бронхоальвеолярная жидкость), кровь. Отбор, транспортировку клинического материала проводили в соответствии с МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории» [12].

Исследования осуществлялись методом ПЦР: традиционная ПЦР, ПЦР минипулов. Для проведения ПЦР использовали амплификаторы «Терцик МС-2» (ДНК-технология, г. Москва), Gene Cyler (Bio-Rad, США). Использованы тест-системы «АмплиСенс» производства ЦНИИЭ (г. Москва) и Gene Pak DNA PCR фирмы «Изоген». Выявляли следующие инфекционные агенты: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Adenovirus*, *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex I/II*. Чувствительность тест-систем согласно паспортным данным составляет 1000 клеток или вирионов в 1 мл.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью методов вариационной статистики. Достоверность различий определяли общепринятым методом расчета ошибки среднего ( $m$ ) и показателя существенности и вероятности ( $t$ ) по Стьюденту. Достоверными считались гра-

ницы, установленные при вероятности безошибочного прогноза  $p < 0,05$ . Качественные признаки представлены с указанием стандартной ошибки доли ( $\pm m$ ).

Обработка данных выполнялась на персональном компьютере с использованием прикладных программ Microsoft office (Excel), пакета статистических программ Statz, Statistica 6,0.

**Результаты и обсуждение.** В ходе исследования нами был разработан оптимальный алгоритм ПЦР-диагностики внебольничной пневмонии, основанный на одномоментном анализе смеси субстратов (кровь, мокрота, слюна, мазки со слизистой носоглотки, бронхоальвеолярная жидкость) на весь спектр распространенных и клинически значимых возбудителей.

Исследование пула смеси субстратов одновременно на комплекс инфекционных агентов позволило снизить себестоимость анализа в 3-4 раза и увеличить вероятность выявления возбудителя.

Этиологию внебольничной пневмонии удалось установить в 88,5 $\pm$ 2,4% случаев. При этом основным возбудителем являлся *Streptococcus pneumoniae*, выделенный у 86,3 $\pm$ 2,6% больных. Второе место в этиологической структуре внебольничной пневмонии заняли *Haemophilus influenzae*, частота выявления которых составила 41,2 $\pm$ 3,7%. Представительство других возбудителей было следующим: *Mycoplasma pneumoniae* – 23,6 $\pm$ 3,2%, *Chlamydia pneumoniae* – 6,7 $\pm$ 1,9%, *Moraxella catarrhalis* – 2,5 $\pm$ 1,2%, *Legionella pneumophila* – 0,6 $\pm$ 0,5%, *Adenovirus* – 14,9 $\pm$ 2,7%, *Herpes simplex I/II* – 16,2 $\pm$ 2,8%, *Cytomegalovirus* – 4,1 $\pm$ 1,5% (таблица 1).

**ТАБЛИЦА 1.**  
*Этиологическая структура внебольничной пневмонии*

Возбудитель	Частота выявления (в %)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	86,3 $\pm$ 2,6
<i>Haemophilus influenzae</i>	41,2 $\pm$ 3,7
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	23,6 $\pm$ 3,2
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	6,7 $\pm$ 1,9
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2,5 $\pm$ 1,2
<i>Legionella pneumophila</i>	0,6 $\pm$ 0,5
<i>Chlamydia psittaci</i>	0
<i>Adenovirus</i>	14,9 $\pm$ 2,7
<i>Herpes simplex I/II</i>	16,2 $\pm$ 2,8
<i>Cytomegalovirus</i>	4,1 $\pm$ 1,5

Ни в одном случае нам не удалось обнаружить *Chlamydia psittaci*. Подтвержденное нами доминирующее положение пневмококка в этиологической структуре внебольничной пневмонии согласуется с результатами абсолютного большинства исследований [4, 6, 7, 8].

Значительная частота выявления *Herpes simplex I/II* (16,2 $\pm$ 2,8%) в крови и слюне у больных пневмонией свидетельствует об ослаблении иммунной системы. Цитомегаловирус регистрировался значительно реже. Однако он, как и вирус простого герпеса, является инфекционным агентом, усугубляющим течение пневмонии. Обнаружение вирусов группы герпеса у больных пневмонией требует изменения

акцентов медикаментозного воздействия от антибиотиков широкого спектра к иммуномодулирующей и иммунозаместительной терапии.

Необходимо подчеркнуть, что в отличие от зарубежных авторов, свидетельствующих о значительной этиологической роли *Legionella pneumophila*, нам удалось документировать легионеллезную природу пневмонии лишь у одного пациента. Впрочем, неоднородное региональное представительство *Legionella pneumophila* в этиологии внебольничной пневмонии – хорошо известный факт. Так, например, при исследовании, проводимом в одном из госпиталей Барселоны, частота легионеллезной внебольничной пневмонии тяжелого течения достигала 14%, тогда как сходное исследование во французском медицинском центре Лилль не выявило ни одного случая легионеллезной инфекции [15]. Наличие столь разноречивых эпидемиологических данных, очевидно, свидетельствует об эндемичности, неравномерности распространения легионеллезной инфекции.

Обращает на себя внимание высокая частота выделения *Mycoplasma pneumoniae* – 23,6±3,2%. Однако пневмония микоплазменной природы как моноинфекция обнаружена лишь у 4 пациентов (2,7%). Пневмококки являются преобладающими микроорганизмами, вызывающими внебольничные пневмонии в качестве моноинфекции (28,5±3,4%).

Следует отметить высокую частоту смешанного инфицирования больных пневмониями. Ассоциации возбудителей наблюдались у 65,8±3,6% пациентов. Характерно наличие большого количества вариантов ассоциаций микроорганизмов. Все выявленные возбудители пневмоний чаще обнаруживались в ассоциациях. Среди ассоциаций преобладали варианты из двух микроорганизмов – 53,1±5,6%. Варианты из трех инфекционных агентов составили 34,4±4,3%, из четырех – 12,5±3,7%. Основные варианты ассоциаций возбудителей представлены в таблице 2.

**ТАБЛИЦА 2.**  
Основные варианты ассоциаций возбудителей внебольничных пневмоний

Варианты ассоциаций	Частота выявления	
	Абс.	%
<i>S. pneumoniae</i> - <i>H. influenzae</i>	24	25±3,3
<i>S. pneumoniae</i> - <i>M. pneumoniae</i>	9	9,4±2,2
<i>S. pneumoniae</i> - <i>Adenovirus</i>	6	6,3±1,8
<i>S. pneumoniae</i> - <i>C. pneumoniae</i>	5	5,2±1,6
<i>S. pneumoniae</i> - <i>Herpes simplex I/II</i>	4	4,2±1,5
<i>S. pneumoniae</i> - <i>H. influenzae</i> - <i>M. pneumoniae</i>	7	7,3±1,9
<i>S. pneumoniae</i> - <i>H. influenzae</i> - <i>Herpes simplex I/II</i>	7	7,3±1,9
<i>S. pneumoniae</i> - <i>H. influenzae</i> - <i>Adenovirus</i>	7	7,3±1,9
<i>S. pneumoniae</i> - <i>M. pneumoniae</i> - <i>Adenovirus</i>	4	4,2±1,5
<i>S. pneumoniae</i> - <i>H. influenzae</i> - <i>M. pneumoniae</i> - <i>Adenovirus</i>	3	3,2±1,3
<i>S. pneumoniae</i> - <i>H.influenzae</i> - <i>M. pneumoniae</i> - <i>Herpes simplex I/II</i>	2	2,1±1,0

Как видно из таблицы 2, наиболее распространенный вариант микст-инфекции «*Streptococcus pneumoniae*-*Haemophilus influenzae*» составил 25±3,3% всех ассоциаций.

Исследования проводились в режиме сопровождения лечебного процесса. Своевременная этиологическая диагностика внебольничной пневмонии на ранних стадиях заболевания с использованием метода ПЦР позволила проводить эффективную этиотропную антибактериальную и иммуномодулирующую, иммунозаместительную терапию, сократить сроки пребывания больного в стационаре, сроки реабилитации и снизить риск возникновения осложнений.

**Заключение.** В ходе комплексного ПЦР-обследования 172 больных внебольничной пневмонией различной степени тяжести нам удалось установить этиологию заболевания в 88,5% случаев. Ведущими возбудителями оказались *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*, которые были выявлены в 86,3±2,6% и 41,2±3,7% случаев соответственно. В число актуальных возбудителей внебольничной пневмонии вошли *Mycoplasma pneumoniae* (23,6±3,2%), *Adenovirus* (14,9±2,7%). *Chlamydia pneumoniae* обнаруживается значительно реже (6,7±1,9%). Характерной особенностью внебольничных пневмоний на современном этапе является наличие большого числа ассоциаций микроорганизмов, как бактерий, так и вирусов. Роль *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia psittaci* в этиологии внебольничных пневмоний незначительна. Полученные данные об особенностях этиологической структуры внебольничных пневмоний могут использоваться в клинической практике. Проведенные исследования показали, что метод ПЦР может быть использован в диагностике воспалительных заболеваний органов дыхания, обусловленных как традиционными возбудителями, так и трудно культивируемыми бактериями и вирусами.



#### ЛИТЕРАТУРА

1. Чучалин А.Г. Пневмония /А.Г.Чучалин, А.И. Синопальников, Л.С. Страчунский. М.: МИА, 2006. 464 с.
2. Барлет Джон. Дж. Инфекции дыхательных путей. Пер.с англ. /Джон Дж. Барлет. М.: Бино, 2000. 192 с.
3. Синопальников А.И. Тяжелая внебольничная пневмония: этиологическая структура /А.И. Синопальников, О.В. Фесенко, Ю.Г. Тихонов, В.К. Дуганов. Антибиотики и химиотерапия, 2001. Т. 46. № 6. С. 6-11.
4. Егоров А.М. Хламидии: молекулярная организация клетки и некоторые особенности патогенеза инфекций /А.М. Егоров, Ю.О. Сазыкин. Антибиотики и химиотерапия, 2000. Т. 45. № 4. С. 3-5.
5. Kuroki H. Characterization of children with *Mycoplasma pneumoniae* infection detected by rapid polymerase chain reaction technique /H. Kuroki, M. Morozumi, N.Chiba, K. Ubukata. J.Infect. Chemother., 2004. V. 10. № 1. P. 65-67.
6. Чучалин А.Г. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике /А.Г.Чучалин, А.И. Синопальников, С.В. Яковлев, Л.С. Страчунский. М., 2003. 30 с.
7. Бачинская Е.Н. Возбудители внебольничных пневмоний на пороге нового тысячелетия. Антибиотики и химиотерапия, 2000. Т. 45. № 11. С. 21-28.
8. Белоцерковская Ю.Г. Роль *Chlamydia pneumoniae* в бронхолегочной патологии человека /Ю.Г. Белоцерковская, А.И. Синопальников. Клин. микробиология и антимикроб. Химиотерапия, 2008. Т. 10. № 1. С. 15-24.

9. Welte M. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. /M. Welte, K. Jaton, M. Altwegg et al / *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.*, 2003. V. 45. № 2. P. 85-95.
10. Schneeberger P.M. Diagnosis of atypical pathogens in patients hospitalized with community-acquired respiratory infection /P.M. Schneeberger, J.W. Dorigo-Zetsma, A. van der Zee et al. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2004. V. 36. № 4. P. 269-273.
11. Ursi D. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples by real-time PCR using an inhibition control /D. Ursi, K. Dirven, K. Loens et al. *J. Microbiol. Methods.*, 2003. V. 55. P. 149-153.
12. МУ 4.2.2039-05. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. Утв гл. гос. сан. врачом РФ Г.Г. Онищенко 23.12.2005.
13. МУ 1.3.1794 – 03 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности». Москва, 2003 г. Утв. гл. гос. сан. врачом РФ Г.Г. Онищенко 05.12.2003 г.
14. МУ 1.3.1888-04 Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности. Москва, 2004 г. Утв. гл. гос. сан. врачом РФ Г.Г. Онищенко 04.03.2004 г.
15. Темежникова Н.Д. Лабораторная диагностика лигионеллеза /Н.Д. Темежников. Клиническая лабораторная диагностика, 2008. № 11. С. 34-39.