



С.А.Рачина, Р.С.Козлов

## Современные подходы к микробиологической диагностике при внебольничной пневмонии

ГОУ ВПО "Смоленская государственная медицинская академия" Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию: 214019, Смоленск, ул. Крупской, 28

S.A.Rachina, R.S.Kozlov

## Modern approach to microbiological diagnosis of community-acquired pneumonia



**Key words:** community-acquired pneumonia, etiology, microbiological diagnosis.

**Ключевые слова:** внебольничная пневмония, этиология, микробиологическая диагностика.

Внебольничная пневмония (ВП) — широко распространенное заболевание, являющееся ведущей причиной заболеваемости и смертности от инфекционных болезней у взрослых в развитых странах [1–4]. Согласно данным государственного доклада о состоянии здоровья населения РФ в 2003 г., пневмония является важной причиной внутрибольничной летальности (> 10 %), а уровень диагностических ошибок при данном заболевании достигает 40 % [5].

Основу терапии ВП на сегодняшний день составляет антибактериальная терапия (АБТ), которая, как правило, проводится эмпирически. Необходимость этиологической диагностики ВП определяется следующими факторами [6]:

1. Своевременно выполненные микробиологические исследования при ВП позволяют скорректировать АБТ у конкретного пациента — в частности, при выделении необычного возбудителя, который не принимался в расчет при выборе препаратов для эмпирической терапии и / или в случае неожиданного профиля его резистентности к антимикробным препаратам (АМП). Использование деэскалационной терапии или переход с АМП широкого спектра (или комбинированной терапии) на препарат узкого спектра (или монотерапию) при установленном этиологическом диагнозе ВП будет способствовать сокращению затрат, уменьшению риска развития нежелательных лекарственных реакций и селекции антибиотикорезистентности.
2. Исследования, направленные на выявление ряда потенциальных возбудителей ВП, могут иметь важное эпидемиологическое значение с точки зрения профилактики эпидемий (ТОРС-ассоциированный коронавирус, вирус гриппа, *Legionella spp.*)

и выявления фактов биотерроризма (возбудитель чумы, туляремии, сибирской язвы).

3. С точки зрения общественной пользы мониторинг структуры возбудителей ВП и их чувствительности к АМП необходим для адекватного формирования рекомендаций по эмпирическому выбору АБТ у разных категорий пациентов и ее своевременной коррекции.

В тоже время микробиологическая диагностика ВП по-прежнему представляет серьезную проблему не только в повседневной клинической практике, но и при проведении исследований. Поэтому, даже при использовании разнообразных методов, этиологический диагноз удастся установить в < 50 % случаев [7–9].

Микробиологическая диагностика при ВП характеризуется следующими особенностями [10, 11]:

- Возбудителями могут быть довольно большой круг микроорганизмов из разных классов, что определяет широкий перечень биологических материалов и методов их исследования.
- Материал, используемый для микробиологической диагностики, чаще всего оказывается контаминированным микрофлорой верхних дыхательных путей (ВДП) и полости рта, что затрудняет интерпретацию полученных данных.
- Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* и *Staphylococcus aureus*, являясь нечастыми возбудителями ВП, могут колонизировать мокроту и маскировать пневмококковую и аспирационную пневмонию.
- Предшествующая АБТ искажает первичную этиологию заболевания и затрудняет постановку этиологического диагноза [12].

Для микробиологической диагностики ВП используется различный биологический материал —

мокрота, промывные воды бронхов, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), браш-биоптаты, плевральный экссудат, пунктаты и биоптаты легочной ткани, цельная кровь, сыворотка крови, моча, мазки из ротоглотки.

Наиболее распространенным клиническим материалом при ВП является свободно отделяемая мокрота [6, 13]. Мокрота наиболее доступна для исследования, однако по специфичности результатов она в большинстве случаев уступает образцам, получаемым инвазивными методами, т. к. всегда оказывается контаминированной микрофлорой ротоглотки и ВДП.

Повышению результативности микробиологического исследования мокроты у пациентов с ВП способствует соблюдение определенных правил ее сбора, хранения и транспортировки [14]. Мокроту предпочтительнее собирать утром натощак; перед сбором мокроты необходимо почистить зубы и прополоскать рот кипяченой водой; сроки доставки образца в лабораторию не должны превышать 2 ч с момента получения (допускается хранение в холодильнике не более 6 ч), в противном случае резко падает вероятность выявления *Streptococcus pneumoniae* и наблюдается активное размножение контаминирующих мокроту бактерий. Диагностическая ценность мокроты также зависит от уровня профессионализма персонала бактериологической лаборатории и факта предшествующей АБТ [15, 16].

Первый этап исследования мокроты при ВП предполагает бактериоскопию мазка, окрашенного по Граму, для оценки ее качества и пригодности для дальнейших исследований. Диагностический критерий качественной мокроты – наличие  $\geq 25$  полиморфно-ядерных лейкоцитов и  $< 10$  эпителиальных клеток при просмотре 10 полей зрения под малым увеличением микроскопа. При варьирующих показателях чувствительности и специфичности бактериоскопия может использоваться для ранней этиологической диагностики ВП, вызванной пневмококками (характерно наличие большого количества грамположительных диплококков в мазке гнойной мокроты при окраске по Граму), помогает в правильной интерпретации результатов культурального исследования в случае выделения условно-патогенных микроорганизмов [10, 11, 17]. Бактериоскопия мазков мокроты, окрашенных специальными методами, применяется в диагностике поражений легких, вызванных такими микроорганизмами, как *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis jiroveci*.

Этиологический диагноз ВП при бактериологическом исследовании мокроты считается достоверным только в случае обнаружения облигатных патогенов (*Legionella pneumophila*, респираторные вирусы и др.) [16]. При выделении условно-патогенных микроорганизмов, которые могут быть частью нормальной микрофлоры, таких как пневмококк, *Haemophilus influenzae*, оценка их этиологической значимости определяется в совокупности с данными клинической картины и бактериоскопии окрашенного по Граму мазка [16].

Значимость культурального исследования мокроты возрастает при подозрении на инфицирование амбулаторными штаммами метициллинорезистентного золотистого стафилококка (CA-MRSA), т. к. их выявление требует совершенно иного подхода к АБТ. Согласно рекомендациям Американского торакального общества / Американского общества инфекционных болезней в случае некротизирующей и абсцедирующей пневмонии культуральное исследование мокроты должно проводиться у всех пациентов [6].

Так как мокроту при ВП удается получить далеко не в 100 % случаев, для этиологической диагностики ВП могут использоваться другие респираторные образцы. Однако получение большинства из них сопряжено с некоторыми техническими сложностями и требует участия квалифицированного персонала. Кроме того, информативность БАЛ, бронхоскопии с защищенной браш-биопсией и трансторакального аспирата для терапии ВП не изучалась в проспективных клинических исследованиях [5]. Исследование инвазивных образцов рекомендуется проводить, в первую очередь, у пациентов с иммунодефицитом, при тяжелой ВП, а также в случае неэффективности стартовой АБТ [6, 13]. Клинически значимыми считаются микроорганизмы, выделенные из БАЛ в количестве  $> 10^4$  КОЕ / мл, из биоптата, полученного с помощью защищенных щеток, –  $> 10^3$  КОЕ / мл [11].

Мазки из ротоглотки используются для выявления респираторных вирусов и "атипичных" возбудителей методами амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) [11].

Исследование плевральной жидкости предусматривает бактериоскопию мазка, окрашенного по Граму или другими методами (например, с целью выявления микобактерий), с последующим культуральным исследованием [6, 10, 11, 13]. Оно выполняется при наличии плеврального выпота и условий безопасного проведения плевральной пункции (визуализация на латерограмме свободно смещаемой жидкости с толщиной слоя  $> 1,0$  см). При исследовании возможно выявление как аэробных, так и анаэробных возбудителей.

Бактериemia может встречаться при инфицировании разными возбудителями (энтеробактерии, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae*), однако наиболее часто выявляется при ВП пневмококковой этиологии [6, 7, 11]. Исследование крови культуральным методом характеризуется высокой специфичностью [14]. Однако чувствительность метода в этиологической диагностике ВП является достаточно низкой. Так, частота положительных результатов гемокультуры в когорте госпитализированных пациентов с ВП, по данным нескольких зарубежных исследований, варьировалась от 5 до 14 % [18, 19]. Частота положительных результатов гемокультуры зависит от тяжести течения ВП, присутствия факторов риска бактериемии, предшествующей АБТ и соблюдения правил получения, хранения и транспортировки клинического материала. Так, получение образцов крови на фоне АБТ, как минимум, в 2 раза

снижало результативность данного метода исследования [20]. Повышению диагностической ценности метода способствует соблюдение правил сбора образцов — необходимо получение оптимального объема крови, составляющего у взрослых 20–30 мл, при этом соотношение крови с питательной средой должно быть 1 : 5 — 1 : 10; кровь получают при венепункции из 2 разных периферических вен с интервалом 30–40 мин, что снижает частоту ложно-положительных результатов исследования; для посева предпочтительно использовать коммерческие флаконы с питательными средами.

Исследование мочи в настоящее время проводится с целью выявления растворимых антигенов ряда возбудителей, в частности *L. pneumophila* и *S. pneumoniae*. Основное преимущество данных методов исследования — возможность получения результатов в короткие сроки после сбора образцов. Экспресс-тесты у взрослых пациентов с ВП демонстрируют достаточно вариабельную чувствительность, но высокую специфичность [13].

Образцы сыворотки крови исследуют у пациентов с ВП в острый период и период реконвалесценции с целью выявления специфических антител, относящихся к иммуноглобулинам разных классов. Серологические исследования чаще всего применяются для диагностики "атипичных" возбудителей и респираторных вирусов [10].

### Особенности диагностики ВП, вызванной различными возбудителями

Для диагностики ВП пневмококковой этиологии наиболее часто используют бактериоскопию мазка мокроты, окрашенного по Граму [21]. Следует отметить, что *S. pneumoniae* относится к "привередливым" микроорганизмам, для его выделения из клинического материала необходимо использовать питательные среды, обогащенные дефибринированной кровью животных (барана, лошади или козла) в 5%-ной концентрации [21]. Еще одно условие культивирования пневмококков — инкубация в атмосфере с повышенным до 3–7 % содержанием CO<sub>2</sub>, т. к. они являются факультативными анаэробами [21].

Ключевым тестом дифференциации пневмококков от других  $\alpha$ -гемолитических стрептококков является чувствительность к оптохину [21]. Однако среди *S. pneumoniae* растет число оптохинорезистентных штаммов, что требует использования альтернативных методов идентификации возбудителя (лизис в присутствии солей желчных кислот, латекс-агглютинация с поливалентной пневмококковой антителосывороткой и др.).

Среди некультуральных методов диагностики *S. pneumoniae* наибольшее распространение в последние годы получил иммунохроматографический тест, предусматривающий выявление пневмококкового клеточного полисахарида (С-полисахарида) в моче, который с середины 2008 г. доступен в РФ. Основное его преимущество — возможность использования "у постели больного" в связи с простотой

выполнения и получением результата в течение 15 мин с момента постановки. Пневмококковый экспресс-тест демонстрирует приемлемую чувствительность (50–80 %) и достаточно высокую специфичность (> 90 %) при ВП у взрослых [22–24]. По мнению специалистов, его использование наиболее перспективно при невозможности получения качественного образца мокроты, у пациентов, уже получающих системную АБТ (предшествующий прием АМП существенно снижает информативность культурального исследования). К недостаткам экспресс-теста относятся возможность получения ложноположительных результатов при пневмококковом носительстве и у лиц, недавно перенесших ВП [25].

У взрослых ВП вызывается нетипируемыми штаммами *H. influenzae*. Для этиологической диагностики ВП, вызванной *H. influenzae*, основное значение имеет культуральный метод. Гемофильная палочка также относится к категории "прихотливых" микроорганизмов, требующих для культивирования наличия в питательных средах факторов X, V и 5–7 % CO<sub>2</sub> в атмосфере инкубации [7]. Для выделения гемофильной палочки из клинического материала обычно используется шоколадный агар; идентификация возбудителя основана на определении потребности выделенного микроорганизма в V- и X-факторах и результатах биохимических тестов [14, 26].

Следует отметить, что нетипируемые штаммы *H. influenzae* входят в состав нормальной микрофлоры ВДП, причем частота бессимптомного носительства у взрослых достигает 75 % [26]. Более высокую диагностическую ценность при ВП у взрослых в случае подозрения на *H. influenzae* имеет исследование инвазивных респираторных образцов, в частности БАЛ и транстрахеального аспирата [10].

В диагностике ВП, вызванной энтеробактериями, основная роль также принадлежит культуральному исследованию (посев клинического материала осуществляется на селективные среды — агар Эндо или *McConkey*). Несмотря на то, что энтеробактерии, в частности *Klebsiella pneumoniae*, не являются частыми возбудителями, их выявление нередко ассоциируется с тяжелым течением заболевания и неблагоприятным прогнозом. Следует отметить, что с возрастом, при наличии хронических сопутствующих заболеваний, а также недавней системной АБТ, частота колонизации ВДП энтеробактериями возрастает. Этот факт необходимо учитывать при клинической интерпретации результатов бактериологического исследования респираторных образцов, особенно мокроты.

При подозрении на ВП, вызванную *S. aureus*, важное значение приобретает не только выделение и идентификация возбудителя культуральным методом (посев на желточно-солевой агар или *Mannitol Salt Agar*), но и определение его чувствительности к оксациллину [11]. Несмотря на отсутствие фактов выявления CA-MRSA у пациентов с ВП на территории РФ, опасность их появления и распространения является вполне реальной. Среди фенотипических

методов детекции метициллинорезистентности наиболее часто используются скрининг на агаре Мюллера–Хинтона с добавлением 4%-ного NaCl и оксациллина в концентрации 6 мг/л, тестирование диско-диффузионным методом с диском, содержащим 1 мг оксациллина или 30 мкг цефокситина [11, 27]. Все больший интерес для подтверждения инфицирования MRSA привлекают генетические методы, отличающиеся более высокой точностью и скоростью получения результата [27].

Для диагностики ВП, вызванной *Legionella spp.*, используются следующие методы [28, 29]:

1. Культуральное исследование.
2. Определение уровня антител серологическими методами в острый период заболевания и в период реконвалесценции.
3. Выявление растворимого антигена *L. pneumophila* 1-й серогруппы в моче.
4. Детекция ДНК возбудителя МАНК.
5. Обнаружение *Legionella spp.* в респираторных образцах с помощью реакции прямой иммунофлюоресценции (ПИФ).

Культуральное исследование является "золотым стандартом" диагностики болезни легионеров, т. к. характеризуется 100%-ной специфичностью, может использоваться для выявления легионелл различных видов и *L. pneumophila* разных серогрупп [29–32]. Для выделения легионелл используется различный клинический материал – мокрота, инвазивные респираторные образцы (БАЛ, биоптаты и т. д.), плевральная жидкость, аутопсийный материал [29]. Легионеллы культивируют на буферном угольно-дрожжевом агаре с  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой (среда ВСУЕ $\alpha$ ), а также в специально разработанных коммерческих средах (например, *Legionella agar base*). Для подавления роста колонизирующих мокроту микроорганизмов, которые могут маскировать рост легионелл и затруднять выделение чистой культуры, в среду обычно добавляют АМП (полимиксин, анизомицин, цефамандол или ванкомицин) [28]. Рост колоний *Legionella spp.* из клинического материала наблюдается не ранее 3–5-х сут. и наиболее заметен к 8–10-м сут. [28]. Идентификация выросших колоний проводится по фенотипическим признакам, либо по реакциям иммунофлюоресценции или латекс-агглютинации с использованием коммерческих наборов [28].

Чувствительность культурального исследования зависит от тяжести ВП и может варьироваться от 15 до 25 % – при нетяжелой, до > 90 % – при тяжелой ВП, требующей респираторной поддержки [33]. Чувствительность культурального метода, как правило, выше в лабораториях, специализирующихся на выявлении легионелл. Следует отметить, что меньше половины пациентов с легионеллезной ВП продуцируют мокроту, поэтому при наличии клинических показаний и подозрении на легионеллез целесообразно использовать инвазивные респираторные образцы [28, 31]. Необходимо отметить, что у многих пациентов с легионеллезной пневмонией мокрота не является гнойной. Как показали

*J.G. Ingram et al.*, при использовании стандартных подходов к оценке качества мокроты до 84 % образцов, позитивных на *L. pneumophila*, не подлежали культуральному исследованию [34]. Ценность культурального исследования заключается в возможности выделения чистой культуры и проведении эпидемиологического расследования на основании фенотипического и генотипического сравнения штаммов [31].

Для диагностики легионеллезной инфекции в настоящее время доступны различные методы выявления специфических антител – метод непрямой иммунофлюоресценции, который в историческом плане был первым и использовался для исследования сывороток у пациентов во время вспышки легионеллеза в Филадельфии, иммуноферментный анализ (ИФА), ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) и др. [31]. Чувствительность серологических методов диагностики варьируется от 41 до 94 % [35]. Так, при исследовании сывороток пациентов с легионеллезной инфекцией во время вспышки в Нидерландах чувствительность ELISA, ИФА и реакции микроагглютинации составила 64, 61 и 44 % соответственно [36]. Иммунологический ответ при легионеллезной инфекции характеризуется, в первую очередь, появлением антител класса IgM, поэтому их выявление повышает чувствительность серологических методов исследования. У 25–40 % пациентов с легионеллезной инфекцией сероконверсия происходит в течение недели с момента появления симптомов [35]. Четырехкратное повышение титра антител, как правило, отмечается к 3–4-й нед., но в некоторых случаях может занимать > 10 нед. [37]. Отмечены случаи сероконверсии у клинически здоровых лиц без признаков инфекции [29]. Следует отметить, что чувствительность и специфичность сероконверсии, рассматриваемой как диагностически значимый критерий легионеллезной инфекции, хорошо изучена только для *L. pneumophila* 1-й серогруппы [31]. Кроме того, с учетом необходимости получения парных сывороток серологическая диагностика носит ретроспективный характер и не влияет на лечение конкретного пациента.

Метод ПИФ разработан *W.B. Cherry et al.* для выявления *Legionella spp.* в клиническом материале в острый период инфекции [38]. Обычно для исследования используют инвазивные респираторные образцы или плевральную жидкость [28]. Чувствительность метода составляет 25–70 % [29]. Специфичность – широко варьируется; высокая частота ложноположительных результатов характерна для регионов с низкой распространенностью возбудителя и при использовании тест-систем с поликлональными антителами [28, 29]. В то же время ПИФ является весьма надежным методом идентификации *L. pneumophila* в чистой культуре [29].

В настоящее время широкое распространение для диагностики ВП, вызванной *L. pneumophila* 1-й серогруппы, получили методы обнаружения растворимого антигена возбудителя в моче. Антиген, являющийся компонентом клеточной стенки, обнаружи-



вается в моче с первых дней развития заболевания и может определяться в моче до 1 года [30, 39]. Разработанные для детекции растворимого антигена тест-системы используют разные методы — ИФА, иммунохроматографический, агглютинации, радиоиммунный [31]. В настоящее время активно изучается возможность использования других клинических образцов для определения растворимого антигена.

Иммунохроматографический тест *Binox NOW*, предназначенный для экспресс-диагностики легионеллезной инфекции, 19 июня 2008 г. зарегистрирован в РФ [30]. Появление и внедрение тестов на антигенурию явилось революционным событием в изучении эпидемиологии легионеллезной инфекции в мире, резко повысив выявляемость спорадических случаев, и эпидемических вспышек [40].

Чувствительность теста для выявления *L. pneumophila* 1-й серогруппы составляет 70–80 %, а специфичность достигает 99 % [31]. Как показывают исследования, чувствительность зависит от тяжести заболевания — так, у пациентов с легкой инфекцией этот показатель составлял 40–53 %, а при тяжелой легионеллезной ВП, требующей неотложной терапии, достигал 88–100 % [31]. Чувствительность теста выше при исследовании концентрированной мочи и детекции случаев легионеллеза, связанных с путешествиями (*travel-associated* легионеллез) [31, 41]. Последнее обстоятельство обусловлено различиями в частоте встречаемости разных серотипов *L. pneumophila* и разных видов легионелл при легионеллезной инфекции, ассоциированной с путешествиями, при внебольничных и нозокомиальных случаях.

Следует иметь в виду, что отрицательный тест на легионеллезную антигенурию не исключает диагноза легионеллезной ВП, т. к. он не обладает достаточной чувствительностью для выявления *L. pneumophila* других серогрупп и легионелл других видов. Кроме того, т. к. тест может оставаться позитивным длительное время, он имеет диагностическую ценность только при наличии клинических проявлений заболевания.

МАНК, в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ПЦР в реальном времени, рассматриваются как весьма перспективные методы выявления *Legionella spp.* как в клиническом материале, так и в объектах окружающей среды [33, 42, 43].

В качестве мишеней для амплификации используются различные участки ДНК *L. pneumophila* — гены, кодирующие 5S РНК, 16S РНК, *mip* (*macrophage infectivity potentiator*) ген, спейсерные участки между генами, кодирующими 16S и 23S РНК, 23S и 5S РНК, ген *dnaJ* [42]. Разрабатываемые в последнее время тест-системы используют ПЦР в реальном времени, которая позволяет определять количество ДНК в анализируемом образце [42].

Для исследования методом ПЦР могут использоваться как респираторные образцы (например, БАЛ, мокрота), так и сыворотка крови, моча, лейкоциты, что особенно важно при обследовании пациентов с непродуктивным кашлем [31, 42].

При исследовании образцов из нижних дыхательных путей чувствительность метода ПЦР эквива-

лентна или превосходит таковую культурального исследования [33, 44]. Чувствительность при исследовании нереспираторных образцов варьируется от 30 до 86 % [45–48].

Вопрос о специфичности ПЦР при исследовании респираторных образцов является достаточно противоречивым. Несмотря на ложноположительные результаты, о которых сообщается в литературе, интерпретировать их сложно в связи с недостаточной высокой специфичностью методов, которые используются в качестве референтных, особенно в условиях низкой распространенности возбудителя [31].

При оценке контроля качества детекции *Legionella spp.* методом ПЦР в 2004 г. в 46 лабораториях Европы, большинство из которых использовало "домашние" тест-системы, частота ложноположительных результатов составила 4 %, в 2005 г. — 8,2 % [49].

Агентством по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA, США) официально зарегистрирована только 1 тест-система (*BD Probe-Tec ET L. pneumophila*) для исследования мокроты, которая выявляет 1–14-й серотипы *L. pneumophila* [6]. Однако эксперты отмечают, что она недостаточно валидирована для диагностики легионеллезной инфекции у пациентов с ВП в реальной клинической практике.

Для диагностики ВП, вызванной *Mycoplasma pneumoniae*, применяется культуральное исследование, иммунологические методы (включающие как выявление антигенов, так и определение специфических антител) и МАНК [50, 51].

Культуральный метод является трудоемким и дорогостоящим, т. к. *M. pneumoniae* относится к медленно растущим бактериям, чрезвычайно требовательным к условиям культивирования [50, 51]. Для роста микоплазм необходимы исключительно богатые питательные среды, а также поддержание определенного осмотического давления. Инкубация продолжается в течение нескольких недель, что нередко приводит к контаминации посева другими менее прихотливыми микроорганизмами.

При бактериологическом исследовании орофарингеальных образцов следует учитывать присутствие в них других видов микоплазм, являющихся комменсалами человека, поэтому для окончательной видовой идентификации *M. pneumoniae* помимо биохимических тестов используются дополнительные методы исследования (иммуноблоттинг с моноклональными антителами, ПЦР и др.) [51].

Чувствительность культурального исследования даже при очень четком выполнении всех процедур по хранению, транспортировке клинического материала и соблюдению оптимальных условий для культивирования в лабораториях, имеющих опыт работы с микоплазмами, не превышает 60 % [51]. В то же время специфичность его при использовании дополнительных тестов для видовой идентификации *M. pneumoniae* достигает 100 %. При интерпретации результатов культурального исследования следует учитывать возможность бессимптомного носительства и персистенции *M. pneumoniae* в ВДП после

перенесенной инфекции. Так, частота выявления микоплазм у здоровых лиц может варьироваться, по данным исследований, от 0 до 13,5 % [52–55].

К методам прямой детекции антигенов *M. pneumoniae* в респираторных образцах относятся ПИФ, встречный иммуноэлектрофорез, иммуноблотинг, ИФА [51]. Их использование в последнее время значительно сократилось в связи с невысокой чувствительностью и возможностью перекрестных реакций с другими видами микоплазм. Так, например, концентрация *M. pneumoniae* в мокроте обычно составляет  $10^2$ – $10^6$  КОЕ / мл, а порог детекции антигенов вышеуказанными методами –  $10^3$ – $10^4$  КОЕ / 100 мкл образца [51].

Серологические методы в течение многих лет играли ключевую роль в диагностике микоплазменной инфекции. Наиболее ранний из них – выявление антител к гликолипидному антигену *M. pneumoniae* в реакции связывания комплемента (РСК) – характеризовался высокой частотой перекрестных реакций с другим видом микоплазм (*M. genitalium*), тканями и биологическими жидкостями человека [56]. Кроме того, в РСК определялись преимущественно IgM, что ограничивало их диагностическую ценность первичным эпизодом микоплазменной инфекции [57]. В настоящее время для выявления антител к гликолипидному и поверхностному белковому антигенам *M. pneumoniae* используют реакцию непрямой иммунофлюоресценции (НИФ), латекс-агглютинации, ИФА и его модификации [51].

Реакция НИФ требует наличия флуоресцентного микроскопа, а оценка результатов является достаточно субъективной; ложноположительные результаты возможны в присутствии ревматоидного фактора и высокого уровня антител к *M. pneumoniae* класса IgG [51]. В реакции латекс-агглютинации выявляются одновременно IgG и IgM [51]. В ряде сравнительных исследований реакция латекс-агглютинации уступала по чувствительности и специфичности ИФА, по крайней мере, в детекции IgM [58–60]. ИФА-тест-системы наиболее распространены как коммерческие тесты для диагностики инфекций, вызванных *M. pneumoniae*, что связано с более высокой чувствительностью, возможностью тестировать разное количество сывороток, использовать минимальный объем образца ( $\leq 100$  мкл), проводить серотипирование [51]. Так, по чувствительности выявления острой инфекции у пациентов без иммунодефицита и соблюдению сроков получения образцов сыворотки ИФА превосходил культуральное исследование и не уступал ПЦР [51]. В настоящее время несколько ИФА-тест-систем могут использоваться для экспресс-диагностики.

При использовании серологических методов у взрослых наиболее точная диагностика микоплазменной инфекции обеспечивается при определении IgM и IgG в парных сыворотках, собранных с интервалом не менее 2–3 нед. [51, 61]. Свидетельством острой или недавно перенесенной инфекции может считаться, как минимум, 4-кратное нарастание титра антител. При интерпретации результатов сероло-

гических методов исследования следует учитывать то, что достаточно высокий уровень антител класса IgG к *M. pneumoniae* может сохраняться длительное время после перенесенной инфекции, нарастание титра IgG может быть отсроченным во времени, а IgM у взрослых могут вообще не выявляться [62].

В связи с этим для более точной диагностики *M. pneumoniae*-инфекции целесообразно комбинировать серологические тесты с другими методами, например МАНК [51].

ПЦР приобретает все большее значение в диагностике микоплазменной инфекции, что особенно актуально в связи с низкой доступностью в клинической практике культуральных методов исследования. В качестве мишени для амплификации выбирают гены АТФ-азного оперона, Р1-адгезина, 16S рРНК и др. [42, 51]. Разрабатываются методики детекции микоплазм при помощи "гнездной" ПЦР, которая отличается более высокой чувствительностью, ПЦР в реальном времени [42, 51]. Последняя, помимо выше указанных преимуществ метода, по сравнению с классической ПЦР по аналитическим характеристикам, позволяет определять уровень микробной нагрузки. По мнению ряда исследователей, это может использоваться для дифференциации инфекции с носительством *M. pneumoniae* и оценки степени тяжести инфекционного процесса [63, 64].

Исследования по оценке приемлемости различного клинического материала для выявления *M. pneumoniae* продемонстрировали более высокую диагностическую ценность мокроты по сравнению с орофарингеальными, назофарингеальными мазками или назофарингеальным аспиратом, что объясняется большей концентрацией возбудителя в нижних дыхательных путях [65–67]. Поэтому у пациентов с ВП для культурального исследования и ПЦР следует использовать мокроту, и только при невозможности ее получения – образцы из ВДП [68].

Для лабораторной диагностики *Chlamydia pneumoniae* могут применяться различные методы диагностики – морфологические, культуральные, иммунологические и МАНК [50]. Морфологические методы, основанные на выявлении включений хламидий в мазках-отпечатках, окрашенных по Романовскому–Гимзе и раствором Люголя, имеют, скорее, историческое значение и в клинической практике не используются [50].

Так как *C. pneumoniae* является облигатным внутриклеточным патогеном, она не растет на обычных питательных средах. Для культивирования используются различные клеточные культуры, из которых наибольшую чувствительность демонстрируют HL и Her-2 [69]. *C. pneumoniae* характеризуется медленным и слабо заметным ростом, что нередко требует нескольких пассажей, а также легко погибает в процессе транспортировки клинического материала [11, 69]. Кроме того, культуральное исследование характеризуется невысокой чувствительностью [11, 69, 70]. В связи с указанными выше трудностями, культуральное исследование в настоящее время практически утратило свое значение в практической

медицине и используется только в научных лабораториях [70].

Исследования по обнаружению антигенов в респираторных образцах, в частности с помощью ПИФ, также в настоящее время не используется в качестве самостоятельного метода, а рекомендуется для идентификации культуры при бактериологическом исследовании [70]. Чувствительность метода ПИФ составляет 20–60 %, специфичность — около 95 %, однако последний параметр во многом определяется квалификацией персонала, выполняющего исследование [69].

Широкое распространение в диагностике инфекций, вызванных *C. pneumoniae*, получили серологические методы, из которых в настоящее время используются реакция микроиммунофлюоресценции (МИФ), ИФА и ELISA [69, 70]. Так, в рекомендациях CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) МИФ является единственным принятым методом серологической диагностики, несмотря на его очевидные ограничения [71].

Критерием острой хламидийной инфекции, согласно рекомендациям CDC, является выявление титра антител класса IgM  $\geq 1 : 16$  в одиночной сыворотке или 4-кратное повышение уровня IgG в парных сыворотках [71]. При 1-м эпизоде инфекции в течение 2–3 нед. регистрируется появление антител класса IgM, затем после 6–8-й нед. наблюдается рост уровня IgG, которые могут персистировать длительно [70]. Таким образом, получение парных сывороток с промежутком в 3 нед. у таких пациентов может не выявлять иммунологического ответа [70]. При повторном эпизоде хламидийной инфекции IgM могут отсутствовать вовсе или выявляться в низком титре, нарастание уровня антител класса IgG отмечается в более ранние сроки — уже на 1–2-й нед. с момента начала заболевания [70].

МИФ в многочисленных исследованиях демонстрировал низкую чувствительность и слабую корреляцию с результатами культурального исследования и ПЦР, особенно у детей [72, 73]. Проблемами данного метода также могут быть низкая специфичность вследствие перекрестных реакций как с другими видами хламидий, так и с такими возбудителями, как *Mycoplasma spp.*, *Bartonella spp.* и *Yersinia spp.*, отсутствие стандартизации реагентов, сложность постановки и субъективная оценка результатов [70]. Так, совпадения в оценке результатов МИФ с использованием одних и тех же реагентов и антигенов между лабораториями при исследовании 392 образцов сыворотки составляли 55 % и 38 % в отношении IgA и IgG соответственно [74].

Преимуществами ИФА, по сравнению с МИФ, является объективная оценка результатов и относительная простота постановки теста [70]. Сравнительное исследование 7 коммерческих ИФА или ELISA-тест-систем (одна — с родоспецифическими антигенами) для детекции IgG у 80 здоровых добровольцев с 4 тестами, использующими МИФ, продемонстрировало чувствительность на уровне 88–100 %, специфичность — 42–100 % [75]. Однако, учитывая не-

высокую чувствительность и специфичность МИФ, вряд ли этот тест может рассматриваться как оптимальный референтный метод для диагностики хламидийной инфекции.

Относительно недавно появился иммунохроматографический экспресс-тест для выявления *C. pneumoniae*-специфичных антител класса IgM [76]. Его чувствительность и специфичность в сравнении с МИФ и ИФА составила 100 % и 92,9 % соответственно [76]. Однако перспективы широкого практического применения данного теста пока неясны ввиду ограниченного количества исследований и возможности выявлять только первичный эпизод инфекции.

Следует отметить, что ряд исследователей предлагают рассматривать длительное персистирование антител IgA (или IgG) в качестве маркеров хронической хламидийной инфекции, однако справедливость такого утверждения до настоящего времени не подтверждена исследованиями [70].

Ввиду ограниченных возможностей культурального исследования МАНК рассматриваются как весьма перспективные методы диагностики хламидийной инфекции [69]. В качестве мишеней при детекции *C. pneumoniae* молекулярными методами используют гены, кодирующие 16S рРНК-, 16S-23S-спейсерный участок, гены, кодирующие поверхностные антигены МOMP, протеины 53 kDa, 60 kDa и др. [42]. Для детекции *C. pneumoniae* в клиническом материале (респираторные образцы, кровь, биоптаты сосудистой стенки) применяются различные методы — ПЦР, обратная транскрипция ПЦР, "гнездная" ПЦР, ПЦР в реальном времени, NASBA и др. [42, 70].

При активной разработке коммерческих тестов на основе МАНК для диагностики хламидийной инфекции их реальная клиническая ценность остается не до конца определенной. Это связано как с чрезвычайной вариабельностью самих тестов (различные праймеры, процедура экстракции ДНК и т. д.), так и с дизайном исследований по оценке их чувствительности и специфичности [70]. Кроме того, сам факт выявления ДНК возбудителя, учитывая возможное присутствие *C. pneumoniae* в ВДП у здоровых лиц, создает дополнительные проблемы для интерпретации результатов, полученных при использовании ПЦР. В исследованиях использовались различные клинические образцы, в качестве референтных методов диагностики рассматривались как серологические тесты и культуральное исследование, так и имеющиеся тест-системы на основе МАНК [70]. Таким образом, различный дизайн исследований не позволяет сравнивать полученные в них результаты.

Многоцентровое исследование *K. Loens et al.* выявило высокую вариабельность детекции *C. pneumoniae* в разных лабораториях Бельгии при использовании 15 "домашних" тест-систем на основе ПЦР [77]. В то же время даже коммерчески доступная тест-система, превосходившая по своим аналитическим характеристикам рутинно использовавшиеся "домашние" тест-системы, характеризовалась снижением



чувствительности по мере уменьшения микробной нагрузки, что требует дополнительных исследований по ее валидации на различных клинических образцах [78].

В исследовании *D. Hvidsten et al.* у 127 новобранцев, обследованных во время вспышки респираторной хламидийной инфекции, метод ПЦР при исследовании назофарингеальных мазков по чувствительности уступал нескольким серологическим тестам, в которых предусматривалось обнаружение IgM, однако обеспечивал наиболее высокую специфичность (93 %) [79].

Данные о характере клинического материала, который целесообразно использовать при подозрении на хламидийную инфекцию, также являются противоречивыми. Так, в одном из исследований при анализе различных респираторных образцов, полученных во время вспышки хламидийной инфекции, наибольшая чувствительность при исследовании разными методами (ПЦР, культуральное исследование и определение антигенов методом ИФА) была продемонстрирована для мокроты в сравнении с орофарингеальным и назофарингеальными мазками [80]. Преимущества мокроты как клинического образца также были подтверждены в исследовании *Y. Kuorppa et al.*, что может быть связано с более высокой концентрацией возбудителя в мокроте по сравнению с образцами из ВДП [81].

В то же время, при исследовании *R. P. Verkooyen et al.* разных респираторных образцов методом ПЦР у 156 госпитализированных пациентов с ВП наиболее высокой чувствительностью характеризовалась не мокрота, а назофарингеальные мазки [82]. Хотя в данном случае речь могла идти, скорее, о колонизации ВДП *S. pneumoniae*, нежели об инвазивной инфекции НДП.

В настоящее время активно разрабатываются мультиплексные МАНК, предполагающие одновременную детекцию в исследуемом материале нескольких возбудителей (*M. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *Legionella spp.*) [83]. Однако они нуждаются в дальнейшей валидации. Так, мультиплексная NASBA в реальном времени, разработанная для выявления *M. pneumoniae*, *S. pneumoniae* и *L. pneumophila* в респираторных образцах у пациентов с ВП, по чувствительности уступала тестам, разработанным для выявления каждого из возбудителей [65].

## Литература

1. Статистические материалы "Заболеваемость населения России в 2006 году". ФГУ "Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения" Росздрав. Available from: <http://www.minzdravsoc.ru/docs/mzsr/letters/60>
2. Чучалин А.Г. Белая книга. Пульмонология. М., 2003.
3. Гучев И.А., Синопальников А.И. Современные руководства по ведению внебольничной пневмонии у взрослых: путь к единому стандарту. Клинический микробиол. и антимикроб. химиотер. 2008; 10 (4): 305–321.
4. Jackson M.L., Neuzil K.M., Thompson W.W. et al. The burden of community-acquired pneumonia in seniors: results of a population-based study Clin. Infect. Dis. 2004; 39: 1642–1650.
5. Государственный доклад о состоянии здоровья населения Российской Федерации в 2003 году. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2003.
6. Mandell L.A., Wunderink R.G., Anzueto A. et al. IDSA / ATS Consensus Guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. Clin. Infect. Dis. 2007; 44 (Suppl. 2): S27–S72.
7. Синопальников А.И. Бактериальная пневмония. В кн.: Чучалин А.Г. (ред.). Респираторная медицина. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007. т. 1: 474–509.
8. File T.M. Community-acquired pneumonia. Lancet 2003; 362: 1991–2001.
9. Charles P.G.P., Whitby M., Fuller A.J. et al. The etiology of community-acquired pneumonia in Australia: why penicillin plus doxycycline or a macrolide is the most appropriate therapy. Clin. Infect. Dis. 2008; 46: 1513–1521.
10. Зубков М.Н. Микробиологическая диагностика при легочных заболеваниях. В кн.: Чучалин А.Г. (ред.). Респираторная медицина. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007. т. 1: 238–252.
11. Зубков М.Н., Стецюк О.У., Козлов Р.С., Страчунский Л.С. Этиология и микробиологическая диагностика внебольничных пневмоний. В кн.: Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Чернеховская Н.Е. (ред.). Пневмония. М.: Экономика и информатика; 2002. 9–48.
12. Богданов М.В., Чернеховская Т.В. Влияние "антибиотического" анамнеза на этиологию внебольничных пневмоний. Клинический фармакол. и тер. 1999; 8: 20–22.
13. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Страчунский Л.С. и др. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. М.: ООО "Изд. дом М-Вести"; 2006.
14. МУК 4.2.1890-04. Методические указания. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Клинический микробиол. и антимикроб. химиотер. 2004; 6 (4): 306–359.
15. Musher D.M., Montoya R., Wanahita A. Diagnostic value of microscopic examination of Gram-stained sputum and sputum cultures in patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. Clin. Infect. Dis. 2004; 39: 165–169.
16. Marrie T.J. Etiology of community-acquired pneumonia. In: Marrie T.J., ed. Community-acquired pneumonia. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers; 2001. 131–141.
17. Garcia-Vazquez E., Marcos M.A., Mensa J. et al. Assessment of the usefulness of sputum culture for diagnosis of community-acquired pneumonia using the PORT predictive scoring system. Arch. Intern. Med. 2004; 164: 1807–1811.
18. Campbell S.G., Marrie T.J., Anstey R. et al. The contribution of blood cultures to the clinical management of adult patients admitted to the hospital with community-acquired pneumonia: a prospective observational study. Chest 2003; 123: 1142–1150.
19. Waterer G.W., Wunderink R.G. The influence of the severity of community-acquired pneumonia on the usefulness of blood cultures. Respir. Med. 2001; 95: 78–82.
20. Metersky M.L., Ma A., Bratzler D.W. et al. Predicting bacteremia in patients with community-acquired pneumonia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2004; 169: 342–347.
21. Козлов Р.С. Пневмококки: Прошлое, настоящее и будущее. Смоленск: Смоленск. гос. мед. акад., 2005.
22. Dominguez J., Gali N., Blanco S. et al. Detection of Streptococcus pneumoniae antigen by a rapid immuno-



- chromatographic assay in urine samples. *Chest* 2001; 119 (1): 243–249.
23. *Gutierrez F., Masia M., Rodriguez J.C. et al.* Evaluation of the immunochromatographic Binax NOW assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen in a prospective study of community-acquired pneumonia in Spain. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 36: 286–292.
  24. *Murdoch D.R., Laing R.T., Mills G.D. et al.* Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples from adults with community-acquired pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39 (10): 3495–3498.
  25. *Murdoch D.R., Laing R.T., Cook J.M.* The NOW S. pneumoniae urinary antigen test positivity rate 6 weeks after pneumonia onset and among patients with COPD. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 37 (1): 153–154.
  26. *Богданович Т.М., Стецюк О.У., Кречикова О.И. и др.* Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae*. Метод. рекомендации. Под ред. Л.С.Страчунского. *Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер.* 2000; 2 (2): 93–109.
  27. *Страчунский Л.С., Белькова Ю.А., Дехнич А.В.* Внебольничные MRSA — новая проблема антибиотикорезистентности. *Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер.* 2005; 7 (1): 32–46.
  28. *Тартаковский И.С., Синопальников А.И.* Легионеллез: роль в инфекционной патологии человека. *Клин. микробиол. антимикроб. и химиотер.* 2001; 3: 4–16.
  29. *Legionella.* In: Winn W.C. Jr., Allen S.D., Janda W.M. et al., eds. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 6th ed.: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. 549–565.
  30. Практические рекомендации по диагностике и лечению легионеллезной инфекции, вызванной *Legionella pneumophila* серогруппы 1: Пособие для врачей. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Тартаковский И.С. и др. М., 2009.
  31. *Diederens B.M.W.* Legionella spp. and Legionnaires' disease. *J. Infect.* 2007; 20: 1–12.
  32. *McDade J.E., Shepard C.C., Fraser D.W. et al.* Legionnaires' disease: isolation of bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N. Engl. J. Med.* 1977; 297: 1197–203.
  33. *Murdoch D.R.* Diagnosis of Legionella infection. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 36: 64–69.
  34. *Ingram J.G., Plouffe J.F.* Danger of sputum purulence screens in culture of Legionella species. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 209–210.
  35. *der Boer J.W., Yzerman E.P.* Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 23: 871–878.
  36. *Yzerman E.P., der Boer J.W., Lettinga K.D. et al.* Sensitivity of three serum antibody tests in a large outbreak of Legionnaires' disease in the Netherlands. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55: 561–566.
  37. *Monforte R., Estruch R., Vidal J. et al.* Delayed seroconversion in Legionnaires' disease. *Lancet* 1988; 2: 513.
  38. *Cherry W.B.* Detection of Legionnaires disease bacteria by direct immunofluorescent staining. *J. Clin. Microbiol.* 1978; 8: 329–338.
  39. *Kohler R.B., Winn W.C., Wheat L.J.* Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20: 605–607.
  40. *Тартаковский И.С., Гинцбург А.Л., Михайлова Д.О. и др.* Применение стандартов лабораторной диагностики легионеллеза во время эпидемической вспышки пневмоний в городе Верхняя Пышма Свердловской области. *Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер.* 2007; 9: 298–305.
  41. *Helbig J.H., Uldum S.A., Bernander S. et al.* Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial Legionnaires' disease. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 838–840.
  42. *Екимов А.Н.* Молекулярные методы в этиологической диагностике внебольничной пневмонии. В кн.: Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Страчунский Л.С. Пневмония. М: МИА, 2006. 80–94.
  43. Методические указания по выявлению бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды. МУК 4.2.2217–07. М., 2007.
  44. *Cloud J.L., Carroll K.C., Pixton P. et al.* Detection of Legionella species in respiratory specimens using PCR with sequencing conformation. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 1709–1712.
  45. *Murdoch D.R., Walford E.J., Jennings L.C. et al.* Use of the polymerase chain reaction to detect Legionella DNS in urine and serum samples from patients with pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 1996; 23: 475–480.
  46. *Diederens B.M., de Jong C.M., Marmak F. et al.* Evaluation of real-time PCR for the early detection of Legionella pneumophila DNA in serum samples. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56: 94–101.
  47. *Diederens B.M., Bruin J.P., der Boer J.W. et al.* Sensitivity of Legionella pneumophila DNA detection in serum samples in relation to disease severity. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56: 1255.
  48. *Helbig J.H., Engelstadter T., Maiwald M. et al.* Diagnostic relevance of the detection of Legionella DNA in urine samples by the polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1999; 18: 716–722.
  49. *Mendonca R., Wallace P., NacKay W.G. et al.* External quality assessment for the detection of Legionella pneumophila by nucleic acid amplification technology (NAAT) — a European pilot program. In: Programme and abstract book 21<sup>st</sup> meeting of the European Working Group for Legionella infections. Lisbon; 54.
  50. *Тартаковский И.С.* Современные подходы к диагностике атипичных пневмоний. *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2000; 2: 60–68.
  51. *Waites K.B., Talkington D.F.* Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17: 697–728.
  52. *Dorigo-Zetsma J.W., Zaat S.A., Wertheim-van Dillen P.M. et al.* Comparison of PCR, culture, and serological tests for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae respiratory tract infection in children. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37 (1): 14–17.
  53. *Kai M., Kamiya S., Yabe H. et al.* Rapid detection of Mycoplasma pneumoniae in clinical samples by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* 1993; 38 (3): 166–170.
  54. *Blackmore T.K., Reznikov M., Gordon D.L.* Clinical utility of the polymerase chain reaction to diagnose Mycoplasma pneumoniae infection. *Pathology* 1995; 27 (2): 177–181.
  55. *Gnarpe J., Lundback A., Sundelof B. et al.* Prevalence of Mycoplasma pneumoniae in subjectively healthy individuals. *Scand. J. Infect. Dis.* 1992; 24 (2): 161–164.
  56. *Lind K.* Serological cross-reactions between Mycoplasma genitalium and M. pneumoniae. *Lancet* 1982; 2: 1158–1159.
  57. *Jacobs E.* Serological diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infections: a critical review of current procedures. *Clin. Infect. Dis.* 1993; 17 (Suppl. 1): S79–S82.

58. Barker C.E., Sillis M., Wreghitt T.G. Evaluation of Serodia Myco II particle agglutination test for detecting Mycoplasma pneumoniae antibody: comparison with mu-capture ELISA and indirect immunofluorescence. *J. Clin. Pathol.* 1990; 43: 163–165.
59. Karppelin M., Hakkarainen K., Kleemola M. et al. Comparison of three serological methods for diagnosing Mycoplasma pneumoniae infection. *J. Clin. Pathol.* 1993; 46: 1120–1123.
60. Matas L., Dominguez J., De Ory F. et al. Evaluation of Meridian ImmunoCard Mycoplasma test for the detection of Mycoplasma pneumoniae-specific IgM in paediatric patients. *Scand. J. Infect. Dis.* 1998; 30: 289–293.
61. Thacker W.L., Talkington D.F. Analysis of complement fixation and commercial enzyme immunoassays for detection of antibodies to Mycoplasma pneumoniae in human serum. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000; 7: 778–780.
62. Razin S. Diagnosis of mycoplasmal infections. In: Razin S., Herrmann R., eds. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers; 2002. 531–544.
63. Williamson J., Marmion B.P., Worswick D.A. et al. Laboratory diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection. 4. Antigen capture and PCR-gene amplification for detection of the mycoplasma: problems of clinical correlation. *Epidemiol. Infect.* 1992; 109: 519–537.
64. Dorigo-Zetsma J.W., Zaat S.A., Vriesema A.J. et al. Demonstration by a nested PCR for Mycoplasma pneumoniae that M. pneumoniae load in the throat is higher in patients hospitalised for M. pneumoniae infection than in non-hospitalised subjects. *J. Med. Microbiol.* 1999; 48: 1115–1122.
65. Loens K., Beck T., Ursi D. et al. Evaluation of different nucleic acid amplification techniques for the detection of M. pneumoniae, C. pneumoniae and Legionella spp. in respiratory specimens from patients with community-acquired pneumonia. *J. Microbiol. Meth.* 2008; 73: 257–262.
66. Loens K., Beck T., Ursi D. et al. Development of real-time multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydomphila pneumoniae, and Legionella spp. in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 185–191.
67. Dorigo-Zetsma J.W., Verkooyen R.P., van Helden H.P. et al. Molecular detection of Mycoplasma pneumoniae in adults with community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 1184–1186.
68. Loens K., Van Heirstraeten L., Malhotra-Kumar S. Optimal sampling sites and methods for detection of pathogens possibly causing community-acquired lower respiratory tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47 (1): 21–31.
69. Blasi F., Tarsia P., Aliberti S. Chlamydomphila pneumoniae. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; 15: 29–35.
70. Kumar S., Hammerschlag M.R. Acute respiratory infection due to Chlamydia pneumoniae: Current Status of Diagnostic Methods. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 44: 568–576.
71. Dowell S.F., Peeling R.W., Boman J. et al. Standardizing Chlamydia pneumoniae assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin. Infect. Dis.* 2001; 33: 492–503.
72. Hammerschlag M.R. Chlamydia pneumoniae and the lung. *Eur. Respir. J.* 2000; 16: 1001–1007.
73. Wellinghausen N., Straube E., Freidank H. et al. Low prevalence of Chlamydia pneumoniae in adults with community-acquired pneumonia. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006; 296: 485–491.
74. Littman A.J., Jackson L.A., White E. et al. Interlaboratory reliability of microimmunofluorescence test for measurement of Chlamydia pneumoniae-specific immunoglobulin A and G antibody titers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004; 11: 615–617.
75. Hermann C., Graf K., Groh A. et al. Comparison of eleven commercial tests for Chlamydia pneumoniae-specific immunoglobulin G in asymptomatic healthy individuals. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 1603–1609.
76. Miyashita N., Ouchi K., Kishi F. et al. Rapid and simple diagnosis of Chlamydomphila pneumoniae pneumonia by an immunochromatographic test for detection of immunoglobulin M antibodies. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008; 15: 1128–1131.
77. Loens K., Beck T., Ursi D. et al. Two quality control exercises involving nucleic acid amplification methods for detection of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydomphila pneumoniae and carried out 2 years apart (in 2002 and 2004). *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 899–908.
78. Chernesky M., Smieja M., Schachter J. et al. Comparison of an industry-derived LCx Chlamydia pneumoniae PCR research kit to in-house assays performed in five laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 2357–2362.
79. Hvidsten D., Halvorsen D.S., Berdal B.P. et al. Chlamydomphila pneumoniae diagnostics: importance of methodology in relation to timing of sampling. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; 15 (1): 42–49.
80. Boman J., Allard A., Persson K. et al. Rapid diagnosis of respiratory Chlamydia pneumoniae infection by nested touchdown polymerase chain reaction compared with culture and antigen detection by EIA. *J. Infect. Dis.* 1997; 175 (6): 1523–1526.
81. Kuoppa Y., Boman J., Scott L. et al. Quantitative detection of respiratory Chlamydia pneumoniae infection by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 2273–2274.
82. Verkooyen R.P., Willemse D., Hiep-van Casteren S.C.A.M. et al. Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of Chlamydia pneumoniae respiratory infections. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 2301–2307.
83. Welti M., Jaton K., Altwegg M. et al. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila and Mycoplasma pneumoniae in respiratory tract secretions. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 45 (2): 85–95.

#### Информация об авторах

Рачина Светлана Александровна – к. м. н., ассистент кафедры клинической фармакологии ГОУ ВПО "Смоленская государственная медицинская академия" Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию; тел.: (4812) 61-13-01; e-mail: Svetlana.Ratchina@antibiotic.ru

Козлов Роман Сергеевич – д. м. н., проф., директор НИИ антимикробной химиотерапии ГОУ ВПО "Смоленская государственная медицинская академия" Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию; тел.: 8 (4812) 45-06-02; e-mail: roman@antibiotic.ru

Поступила 02.07.10  
© Рачина С.А., Козлов Р.С., 2010  
УДК 616.24-002-07