

ГЛАВА 3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИ ЛЕГОЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

М.Ю. Чернуха, Л.Р. Аветисян

CHAPTER 3. MICROBIOLOGICAL ASSAYS FOR DIAGNOSIS OF LUNG DISEASE

Marina Yu. Chernukha, Lusine R. Avetisyan

Микроорганизмы, инфицирующие нижние дыхательные пути пациентов с легочными заболеваниями, определяют лечение, качество жизни, а для пациентов с муковисцидозом (МВ) – перспективы для трансплантации и общую выживаемость. Точная и своевременная идентификация возбудителей инфекций дыхательных путей имеет значение для обеспечения своевременного начала лечения соответствующими антибиотиками в целях элиминации бактериальных патогенов и организации надлежащего инфекционного контроля для профилактики распространения патогенных микроорганизмов среди больных. Очень часто правильная микробиологическая диагностика затруднена, так как микробная флора дыхательных путей нередко представлена ассоциациями, а некоторые микроорганизмы проявляют атипичные для своего вида фенотипические свойства, например ауксотрофные *P. aeruginosa* и SCV (*small colony variants* – фенотип мелких колоний) *S. aureus*.

Представления о разнообразии этиологической структуры инфекций нижних дыхательных путей (НДП) эволюционируют параллельно с совершенствованием методов выявления микробных возбудителей и их маркеров, появлением новых технологий, основанных на молекулярно-биологических подходах к этиологической диагностике бронхолегочных инфекций. В настоящее время описано более 100 микроорганизмов, способных вызывать инфекции НДП, почти все они были хотя бы однократно обнаружены при биопсии легочной ткани и в мокроте (табл. 1, 2) [1].

Сложность проведения микробиологической диагностики легочных заболеваний связана со следующими особенностями:

- Значительное разнообразие инфекционных агентов, относящихся к разным классам микроорганизмов, определяет широкий перечень биологических материалов и методов их исследования.
- Секрет, получаемый из нижних отделов дыхательного тракта, контаминирован микрофлорой верхних дыхательных путей (ВДП) и ротовой полости, представленной аэробными, анаэроб-

ными бактериями и грибами в концентрациях 10^{10} – 10^{12} КОЕ/мл.

- Грамотрицательная флора (*Enterobacteriales*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*) в ротоглотке встречается в незначительном объеме. Однако у пациентов, ранее получавших антибиотики или страдающих хроническими заболеваниями – сахарным диабетом, острой лейкемией, хроническим алкоголизмом, – концентрация возбудителей грамотрицательной флоры достигает 10^7 КОЕ/мл. Такой уровень возбудителей создает предпосылки для развития инфекций НДП, так как даже незначительная аспирация секрета ротоглотки (в объеме от 0,1 до 1 мл) приводит к попаданию 10^4 ОЕ/мл в трахеобронхиальное дерево.
- Микроорганизмы семейства *Enterobacteriales* или *Staphylococcus aureus*, колонизирующие мокроту, осложняют диагностику пневмококковой пневмонии, плевропневмонии анаэробной этиологии и туберкулеза легких.
- Предшествующая антибактериальная терапия искажает первичную этиологическую природу инфекционного процесса [1].

Хроническую инфекцию легких при МВ можно рассматривать как модель инфекции, развивающейся при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Ее особенностью является хроническая смешанная инфекция легких, вызванная доминирующими возбудителями *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia complex*, *Achromobacter spp.*, другими неферментирующими микроорганизмами, а также нетуберкулезными микобактериями и грибами.

При изучении микрофлоры НДП различных возрастных групп детей, больных МВ, исследователями различных стран установлено, что доминирующими возбудителями инфекции легких у таких пациентов являются *P. aeruginosa* и *S. aureus*, *H. influenzae*, бактерии комплекса *B. cepacia* (*Bcc*). Показано, что в первые годы жизни у больных МВ доминирует золотистый стафилококк, а затем основным возбудителем становится *P. aeruginosa* [2]. Грибы *Aspergillus*

Таблица 1. Микроорганизмы, наиболее часто выделяемые из различных областей дыхательных путей

Заболевания	Бактерии	Вирусы	Грибы	Другие возбудители
Риниты, синуситы	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseriae</i> spp., <i>Moraxella catarrhalis</i> , аэробные и анаэробные стрептококки, редко грамотрицательные аэробные бактерии и <i>S. aureus</i>	<i>Rhinoviruses</i> , <i>Coronavirus</i> , <i>Parainfluenza viruses</i> , <i>Adenoviruses</i> , <i>Respiratory syncytial virus</i> , <i>Influenza viruses</i>	Редко	Редко
Фарингиты, тонзиллиты	β-гемолитические стрептококки группы А (БГСА; <i>Streptococcus pyogenes</i>); представители родов <i>Corynebacterium</i> (в т. ч. <i>Corynebacterium diphtheria</i>), <i>Neisseriae</i> (в т. ч. <i>Neisseriae subflava</i> , <i>Neisseriae gonorrhoeae</i>), <i>Mycoplasma hominis type 1</i> , <i>Mycoplasma pneumonia</i> , анаэробы	<i>Adenoviruses</i> , <i>Coxsackieviruses A</i> , <i>Influenza viruses</i> , <i>Rhinoviruses</i> , <i>Coronavirus</i> , <i>Parainfluenza viruses</i> , <i>Epstein–Barr virus</i> , <i>Cytomegalovirus</i> , <i>Herpes simplex virus</i>	<i>Candida albicans</i>	Редко
Ларинготрахеиты	<i>Haemophilus influenzae type b</i>	<i>Respiratory syncytial virus</i>	Редко	Редко
Круп	<i>Corynebacterium diphtheria</i>	<i>Parainfluenza viruses</i> , <i>Parainfluenza viruses</i> , <i>Respiratory syncytial virus</i> , <i>Adenoviruses</i> , <i>Herpes simplex virus</i>	Редко	Редко
Бронхиты и бронхиолиты	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i>			
Пневмония	Аэробы и факультативные анаэробы: <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> и прочие <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacteria Burkholderia cepacia complex</i> (Bcc), <i>Achromobacter</i> spp., <i>Legionella</i> spp., <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Nocardia asteroides</i> . Облигатные анаэробы: <i>Actinomyces israelii</i> , <i>Acidaminococcaceae</i> , <i>Peptostreptococcaceae</i> , <i>Eubacteriaceae</i> , <i>Anaerorhabdus furcosa</i> , <i>Bilophila wadsworthia</i> , <i>Fusobacteriaceae</i> , <i>Prevotellaceae</i> . Микобактерии: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Nontuberculosis mycobacterium</i> . Хламидии: <i>Chlamydia psitaci</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> . Микоплазмы: <i>Mycoplasma pneumoniae</i> . Риккетсии: <i>Coxiella burneti</i> . Облигатные патогены: <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Francisella tularensis</i> , <i>Burkholderia mallei</i> , <i>Burkholderia pseudomallei</i> , <i>Yersinia pestis</i>	<i>Adenoviruses</i> , <i>Parainfluenza viruses</i> , <i>Respiratory syncytial virus</i> , <i>Influenza viruses</i> , <i>Avian Influenza (H5N1, H5N6, H7N9)</i> , <i>SARS-CoV</i> , <i>MERS-CoV</i> , <i>SARS-CoV-2</i> , <i>Varicella-zoster virus</i> , <i>Cytomegalovirus</i> , <i>Herpes simplex virus</i> , <i>Hantavirus (Muerto Carryon)</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Blastomyces dermatidis</i> , <i>Pneumocystis jiroveci</i> , <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Filobasidiella (cryptococcus) neoformans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus spp.</i>	

Таблица 2. Микроорганизмы, идентифицированные в мокроте больных муковисцидозом

Типы	Классы	Роды
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Actinobacillus, Aggregatibacter, Chryseomonas, Flavimonas, Haemophilus, Pseudomonas, Stenotrophomonas, Vibrio</i>
	<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Campylobacter</i>
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia (Burkholderia cepacia complex – Bcc), Achromobacter, Kingella, Neisseria, неклассифицируемые Comamonadaceae</i>
	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingobium</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Abiotrophia, Gemella, Granulicatella, Staphylococcus, Streptococcus, неклассифицируемые Staphylococcaceae</i>
	<i>Clostridia</i>	<i>Catonella, Dialister, Moryella, Oribacterium, Peptoniphilus, Peptostreptococcus, Veillonella, неклассифицируемые Clostridiales</i>
	<i>Erysipelotrichi</i>	<i>Bulleidia</i>
<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacterium, Leptotrichia, неклассифицируемые Fusobacteriaceae</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomyces, Atopobium, Corynebacterium, Rhodococcus, Rothia, неклассифицируемые Actinomycetales, неклассифицируемые Bifidobacteriaceae</i>
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella, неклассифицируемые Bacteroidetes, неклассифицируемые Sphingobacteriales, неклассифицируемые Prevotellaceae</i>
	<i>Flavobacteriae</i>	<i>Bergeyella, Capnocytophaga, Cloacibacterium, неклассифицируемые Flavobacteriaceae</i>
<i>Tenericutes</i>	<i>Mollicutes</i>	<i>Mycoplasma</i>
<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetes</i>	<i>Treponema</i>
Неклассифицируемые <i>Bacteria</i>		

fumigatus и грибы рода *Candida* выделяют у пациентов с МВ в более взрослом возрасте, особенно подвергавшихся многократному лечению антибиотиками. В последнее время одной из главных причин, приводящих к летальному исходу, является инфекция, вызванная бактериями *B. cepacia complex*. Эти возбудители способны вызывать так называемый цепа́ция-синдром – некротизирующую пневмонию с септиемией, нередко приводящую к летальному исходу. Инфицирование больных МВ бактериями комплекса *B. cepacia* представляет особую опасность, так как данный микроорганизм обладает природной антибиотикоустойчивостью и быстро приобретает резистентность к широкому спектру антимикробных препаратов. Такие свойства затрудняют эрадикацию бактерий комплекса *B. cepacia* в процессе лечения, способствуют длительной персистенции возбудителя, приводя к быстрому переходу острой инфекции нижних дыхательных путей в хроническую форму и значительным нарушениям функций легких. Больные, инфицированные *B. cepacia complex*, являются источником инфекции и представляют опасность для других пациентов [3]. Кроме того, колонизация

НДП бактериями *B. cepacia complex* до последнего времени была противопоказанием для пересадки легких, считающейся важной частью программы по увеличению продолжительности жизни у пациентов с МВ. Данные последних публикаций и собственные исследования подтверждают значимость в развитии хронической инфекции других видов неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ), среди которых особое значение в связи с большей частотой выделения, по сравнению с другими микроорганизмами и фенотипическому сходству с бактериями *B. cepacia complex*, приобретают бактерии рода *Achromobacter spp.* [4].

При терапии внебольничной пневмонии и ХОБЛ в амбулаторных условиях кроме рутинных микробиологических исследований, позволяющих выделить чистую культуру возбудителя, для подтверждения диагноза необходимо использовать и другие методы исследования: биохимические, молекулярно-биологические, времяпрелетную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF), специфическую диагностику с использованием полимеразной цепной

реакции (ПЦР), мультилокусное секвенирование (MLST), полное геномное секвенирование [4–6]. Независимо от стартовой эмпирической антимикробной терапии и в первую очередь при хронической инфекции легких показано бактериологическое исследование мокроты с определением чувствительности к антибиотикам. Серодиагностика может понадобиться в период эпидемий или по особым клиническим и эпидемиологическим причинам, например для уточнения идентификации.

Набор исследований, которые требуются госпитализированным пациентам, определяется тяжестью заболевания, наличием эпидемиологических факторов риска, неэффективностью проводимой эмпирической терапии.

Биологические материалы для микробиологического исследования

Исследуют мокроту, промывные воды бронхов, транстрахеальный аспират, бронхиальный смыв и бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), браш-биоптаты, плевральный экссудат, пунктат инфильтрата или абсцесса легкого, биоптат легочной ткани, кровь на гемокультуру, сыворотку крови для определения специфических антител, мочу для определения легионеллезного и пневмококкового антигенов, мазки из носа, зева и смывы из ротоглотки при диагностике вирусных инфекций. Результативность исследования возрастает при изучении бронхиального смыва и БАЛ, полученных инвазивными методами. Мокрота – наиболее доступный для анализа материал. По надежности результатов при организации мониторинга микрофлоры НДП не уступает инвазивным методам, хотя отмечается контаминация микрофлорой верхних дыхательных путей и ротоглотки.

Мокрота

Для исследования у больных собирают утреннюю порцию мокроты натощак в объеме 3–5 мл в стерильные флаконы с плотно закручивающейся крышкой. Желательно, чтобы пациент предварительно почистил зубы и прополоскал рот кипяченой водой или раствором гидрокарбоната натрия (1 чайная ложка на стакан воды). Если мокрота выделяется плохо или откашливается эпизодически и в скудном объеме, то накануне вечером и рано утром в день сбора мокроты следует дать больному отхаркивающее средство. При подозрении на туберкулез, пневмоцистную и легионеллезную пневмонию следует применять раздражающие аэрозольные ингаляции [7, 8] путем вдыхания в течение 10–15 мин 30–60 мл подогретого до 42–45 °С раствора, приготовленного на стерильной дистиллированной воде и содержащего 150 г/л хлорида натрия и 10 г/л бикарбоната натрия. Получаемая индуцированная мокрота по качеству идентична откашливаемой [9].

Для диагностики острой бактериальной инфекции достаточно одного образца мокроты. При исследовании на туберкулез или грибковую инфекцию

собирают утреннюю мокроту 3 дня подряд, при этом нежелательно накапливать ее объем свыше 12 ч из-за чрезмерной контаминации посторонней бактериальной флорой. Для диагностики хронической инфекции легких и идентификации микроорганизмов, характеризующихся длительной персистенцией в легких, необходимо проводить мониторинг микрофлоры НДП.

Сроки доставки мокроты в лабораторию не должны превышать 1,5–2 ч с момента ее получения (допускается хранение в холодильнике, но не более 6 ч), так как задержка ведет к аутолизу *S. Pneumonia* и вследствие размножения бактерий-контаминантов меняется истинное соотношение микрофлоры бронхиального секрета.

Перед посевом мокроту промывают в стерильном физиологическом растворе; готовят мазки для микроскопии; разжижают муколитиками или гомогенизируют в асептических условиях со стерильными стеклянными бусами; производят десятикратные серийные разведения в бульоне, из которых делают дозированные высевы на питательные среды с последующей количественной оценкой каждого типа колоний выросших микроорганизмов.

Образцы, отправляемые в референс-лабораторию для посева на МБТ, перевозят в охлажденном состоянии, или их необходимо изначально обработать натрием хлоридом во флаконах или пробирках с плотно закручивающимися крышками, которые затем помещают в металлический сосуд со стенками из адсорбирующего материала и упаковывают в предназначенный для транспортировки контейнер. Образцы для вирусного культивирования должны быть охлажденными, но не замороженными, в то время как для культивирования на хламидии образцы для транспортировки помещают в сахарозо-фосфатную среду и замораживают.

При исследовании на микобактерии туберкулеза для разжижения мокроты перед посевом ее обрабатывают муколитиком (например, ацетилцистеином) в течение 24–48 ч и проводят деконтаминацию 2%-ным раствором каустической соды по Ганеману (не более 15 мин) от посторонних бактерий. После разжижения и деконтаминации образцы центрифугируют (3 800 об./мин), осадок микроскопируют и производят посев. Перед посевом на легионеллы следует применять муколитики для разжижения. Алгоритм микробиологического исследования мокроты представлен на рисунке.

Промывные воды бронхов

Во время вдоха специальным шприцем в трахею вводят 7–10 мл стерильного изотонического раствора, вызывающего кашлевой рефлекс. Недостаток использования такого материала – значительное разведение трахеобронхиального содержимого. Это снижает возможность выделения бактерий, а концентрация их падает примерно в 100 раз по сравнению с мокротой.

Транстрахеальный аспират

Аспират из трахеи и дренирующих бронхов, в т. ч. вблизи очага воспаления легочной ткани, получают с помощью бронхоскопа. Следует помнить, что при введении бронхоскопа происходит контаминация секрета нижних отделов дыхательного тракта флорой ротоглотки. Это искажает истинные результаты. В отличие от мокроты, транстрахеальный аспират (ТТА) можно исследовать на анаэробы.

Бронхоальвеолярный лаваж

БАС, при котором проводят промывание сегмента легких стерильным изотоническим раствором, имеет наибольшее значение при постановке диагноза «пневмония, вызванная микобактериями» [10] и в выявлении *Pneumocystis jirovecii* у пациентов с синдромом приобретенного иммунодефицита (диагностическая эффективность достигает 89–98%) [11], а также цитомегаловируса (ЦМВ) у пациентов с иммунодефицитом или после трансплантации органов [12, 13]. БАЛ можно использовать для культуральной диагностики легионеллезной, хламидийной и вирусной инфекций и для изучения с помощью молекулярных методов [14]. Чувствительность и специфичность метода БАЛ при этиологической диагностике инфекций НДП широко варьируются и в среднем составляют соответственно 69 ± 22 и $88 \pm 14\%$.

Браш-биоптат

Материал получают из бронхов специальной канюлей с защищенными щетками с помощью фиброоптического бронхоскопа. Принцип состоит в использовании системы выдвижных каналов, предохраняющих материал от контаминации микрофлорой ротоглотки при введении и удалении бронхоскопа из нижних отделов дыхательного тракта; это позволяет производить исследования на анаэробы [15, 16].

Плевральная жидкость

Минимальный объем плевральной жидкости, необходимый для выделения бактерий, — 1–5 мл, грибов или микобактерий — не менее 10 мл. Избыток плевральной жидкости или гной транспортируют в стерильных флаконах с плотно завинчивающейся крышкой. При большом количестве материала производят посев в аэробные и анаэробные флаконы со средой для гемокультур в объемном соотношении от 1 : 3 до 1 : 10.

Пунктат инфильтрата или абсцесса легкого

Образцы получают при трансторакальной пункции под рентгенологическим контролем. Материал из абсцесса включает не только гной, но и ткань капсулы, отграничивающей абсцесс. Гной собирают шприцем, в котором его доставляют в лабораторию, либо содержимое переносят в анаэробные системы для транспортировки. Использование тампонов для взятия гноя на анаэробное исследование запрещено.

Биоптат легочной ткани

Трансбронхиальная и открытая биопсия легкого — наиболее агрессивные инвазивные методы, применение которых необходимо для диагностики оппортунистических инфекций у больных иммунодефицитами. В результате появления результативных бронхоскопических методов к инвазивным процедурам стали прибегать значительно реже. Свежесрезанную поверхность используют для приготовления мазков-отпечатков с последующей окраской на легионеллы, пневмоцисты и грибы. Около $\frac{1}{3}$ или $\frac{1}{2}$ образца размельчают в асептических условиях в ступке с абразивным веществом с помощью пестика либо в механическом гомогенизаторе. Размельченную суспензию или гомогенизированный экстракт используют для посева на легионеллы. Экстракт центрифугируют, из осадка готовят окрашенные мазки для выявления пневмоцист. Этот способ более чувствителен в выявлении цист *P. jirovecii* по сравнению с мазками отпечатками или гистологическими препаратами целого легкого. Оставшуюся часть образца размельчают (или гомогенизируют) для последующего микроскопического изучения и культурального исследования суспензии (или экстракта) на бактерии, грибы, вирусы, микоплазмы, хламидии. Гомогенат также можно использовать для изучения молекулярно-генетическими методами.

Кровь на гемокультуру

Целесообразно исследовать в первые 3–4 дня с начала заболевания, когда можно выделить гемокультуры при острой бактериальной пневмонии в 3–37% наблюдений [9]. Необходим посев крови, взятой при двух отдельных венопункциях с интервалом в 30–40 мин, это снижает частоту ложноположительных результатов за счет бактерий-контаминантов кожи на 70%. Если в предшествующие 1–2 нед. больному проводилась антимикробная терапия, кровь на посев берут 2–3 раза в сутки в течение 3 дней. Не следует собирать кровь из внутрисосудистых катетеров, кроме случаев, когда предполагают сепсис катетерного происхождения. Посев осуществляют во флаконы с питательными средами для аэробного и анаэробного культивирования. Перед использованием флаконов визуально определяют прозрачность среды: любое помутнение свидетельствует о ее непригодности. Флаконы хранят в холодильнике, перед использованием (за 30–60 мин) — при комнатной температуре. Оптимальный объем крови для исследования у взрослых составляет 20–30 мл.

Моча

Пневмококки в моче можно выявить у 38% больных при пневмококковой пневмонии [17]. Для посева исследуют утреннюю среднюю порцию свободно выпущенной мочи в объеме 3–5 мл, используя стерильные емкости. Во избежание излишней ее контаминации при мочеиспускании нормальной микрофлорой нижних отделов мочевыводящего

и урогенитального тракта необходимо произвести тщательный туалет наружных половых органов с мылом и кипяченой водой. Посев мочи следует проводить не позднее 2 ч после взятия материала либо в течение 8 ч при условии ее хранения в холодильнике. При проведении скрининговых исследований на микобактерии туберкулеза мочу (в объеме не менее 20 мл) исследуют 3 дня подряд. Для проведения вирусологических исследований (на аденовирусы, ЦМВ) мочу в замороженном виде в объеме 10–15 мл незамедлительно доставляют в лабораторию. Мочу также исследуют на наличие пневмококкового и легионеллезного антигенов.

Мазки из носа, зева и смывы из ротоглотки

Образцы используют для выявления многих респираторных вирусов. Мазки из зева исследуют на наличие *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella spp.* методом ПЦР.

В работе *S. Kabra et al.* сравнивали результаты, полученные при посеве мазков из зева после кашля, мазков из зева до и после физиотерапии и мокроты. Чувствительность для выделения *P. aeruginosa* была 40, 42 и 82%, а для *S. aureus* — 57, 50 и 100% соответственно при посеве мазков из зева после кашля, мазков из зева до и после физиотерапии. Специфичность оказалась высокой 99–100% как для *P. aeruginosa*, так и для *S. aureus*. Таким образом, наиболее значимым исследованием для больных МВ является посев мокроты [18]. По данным *A.C. Equi et al.*, чувствительность и специфичность результатов посевов мазка из зева после кашля по сравнению с результатами посевов спонтанной мокроты составляет 34 и 100% соответственно. Чувствительность показывает процент положительного результата, полученного методом посева мазка из зева, по сравнению с положительным результатом, полученным при посеве мокроты.

Специфичность показывает процент отрицательного результата, полученного методом посева мазка из зева, по сравнению с отрицательным результатом, полученным при посеве мокроты [19].

Сыворотка крови

Образцы сыворотки крови изучают с помощью серологических методов в острый период инфекции и у реконвалесцентов для диагностики пневмоний, вызванных *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, вирусами и грибами.

Транспортировка и хранение

Установлено, что любая задержка, в частности хранение при комнатной температуре (20–25 °С), приводит к увеличению количества быстро растущих бактерий, что может привести к угнетению роста истинных патогенов. И наоборот, хранение в холодильнике (4 °С) может повлечь за собой гибель термофильных патогенных микроорганизмов.

Результаты исследований ученых по данному вопросу противоречивы. Согласно *K. Wong et al.* (1984) и *S.G. Williams et al.* (1978), хранение мокроты при температуре 4 °С в течение 48 ч не оказывает влияние на количественное содержание *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* или *S. pneumoniae*. *F.K. Gould et al.* установили, что в 8,7% образцов клинического материала *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis* и *S. pneumoniae* не выдерживают хранения при температуре 4 °С в течение 48 ч. *A. Pye et al.* показали, что в 24% образцов жизнеспособность *P. aeruginosa* была снижена в 10 раз. Согласно данным *T. Pitt* и *J. Govan*, бактерии *B. cepacia* погибают при хранении мокроты при температуре 4 °С [20].

Методы изучения образцов биологических материалов

Изучение образцов мокроты и других биологических жидкостей следует проводить, начиная от бактериологических, являющихся золотым стандартом, и дальнейшей идентификации микроорганизмов с помощью современных биохимических, физических (MALDI-TOF), молекулярно-генетических (ПЦР, MLST, полное секвенирование генома), серологических методов.

Бактериологическая диагностика

На основании проведенных исследований, многолетнего опыта лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (Москва) и анализа данных зарубежных авторов разработан алгоритм микробиологической диагностики хронической легочной инфекции у больных МВ. Алгоритм может использоваться при микробиологическом исследовании мокроты (биоматериала из дыхательных путей) при других заболеваниях (см. рисунок), а также для идентификации различных видов микроорганизмов не только в мокроте, но и в других биологических жидкостях. Алгоритм идентификации был апробирован при мониторинге хронической инфекции легких у пациентов с МВ, который проводили совместно с Московским центром муковисцидоза и ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России (Москва). Посев мокроты осуществляют на универсальные среды — 5%-ный кровяной, шоколадный агары и на селективные среды для выделения *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Bcc*, *Candida spp.*, *Enterobacteriales* и НГОБ (желточно-солевой агар (ЖСА), цетримидный агар, селективный агар *Burkholderia cepacia* (BCSA), агары Сабура и Эндо).

Обязательным для установления диагноза хронической инфекции, вызванной ассоциацией возбудителей, является неоднократное, в течение 6 мес., выделение чистой культуры микроорганизмов («золотой стандарт»).

При анализе данных бактериологических посевов, полученных с использованием разработанного

алгоритма, установлено, что в группе детей с МВ в возрасте до 1 года *S. aureus* выявляется только у 28,6%, а *P. aeruginosa* — у 19%. В возрасте 5–7 лет золотистый стафилококк обнаруживают у 87,5% детей, а *P. aeruginosa* — у 31,2%. Таким образом, в возрасте до 1 года более чем у $\frac{1}{3}$ больных МВ нижние дыхательные пути еще не обсеменены микроорганизмами, в возрасте 1–4 года нижние дыхательные пути обсеменены почти у всех больных (92,9%), а к 8–18 годам — у 100% больных. Хроническую стафилококковую, синегнойную или смешанную инфекцию начинают диагностировать у 25% детей уже в возрасте 1–4 лет, у 50% — в возрасте 5–7 лет, у 65% — 8–14 лет, у 80% больных МВ — к 18 годам [3]. При этом установлено, что в $\frac{2}{3}$ случаев хроническая инфекция легких осуществляется не монокультурой, а ассоциацией микроорганизмов, причем у госпитализированных больных, в отличие от амбулаторных, эти ассоциации представлены, как правило, не двумя, а тремя и более видами микроорганизмов. За рубежом эти показатели в 2 раза ниже: в 35% исследуемых образцов БАЛ выявляют рост 2 микроорганизмов и в 10% случаев — ассоциации представлены ≥ 3 видами. Наиболее часто встречаются сочетания *P. aeruginosa* и *S. aureus* (18,2%), *P. aeruginosa* и *Bcc* (9,1%). У 18% больных в составе микробных ассоциаций выделяли одновременно мукоидный и немуюкоидный фенотип *P. aeruginosa*.

В составе ассоциаций помимо *P. aeruginosa* часто обнаруживались и другие представители неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов — *B. cepacia complex*, *S. maltophilia*, *A. baumannii*, что, вероятно, обусловлено тропизмом этих видов к легочной ткани. Полученные данные позволили заключить, что для больных МВ характерным проявлением инфекционных осложнений бывает смешанная инфекция.

Таким образом, при анализе микрофлоры у детей с МВ можно утверждать, что с увеличением возраста у больных формируются постоянные очаги хронической легочной инфекции, основными возбудителями которой являются *P. aeruginosa* и *S. aureus* [3].

Хроническая смешанная инфекция, как правило, представляет собой значительно большую проблему, чем моноинфекция, как для врачей, проводящих лечение инфекционного осложнения, так и для микробиологов и эпидемиологов. В экспериментах на мышах было показано, что смешанная инфекция, вызванная *P. aeruginosa* и *Bcc*, вызывает усиление вирулентных свойств возбудителей и в течение суток наблюдается гибель всех животных, т. е. доза заражения вместо LD50 становится LD100 [21, 22]. Полученные данные позволили выдвинуть предположение, что симбиотические взаимоотношения исследуемых бактерий *in vivo* также выражаются в увеличении продукции факторов патогенности и утяжелении инфекционного процесса у животных. Взаимное усиление вирулентности *in vivo* бактерий видов *P. aeruginosa* и *Bcc* свидетельствует о возмож-

ности взаимного использования близкородственными бактериями компонентов регуляторной системы *quorum sensing*. В этом случае бактерии выбирают стратегию развития острой инфекции, что может быть одной из причин ухудшения клинического состояния больных МВ, страдающих смешанной инфекцией. Нами впервые установлено, что более 83% клинических штаммов *Bcc* способны формировать биопленку, колонизировать поверхности органов и тканей, формировать постоянные резервуары инфекции в госпитальной среде. Способность бактерий к формированию биопленки считается маркером возбудителя, который может вызывать хроническую инфекцию. Биопленки являются клинически важными состояниями бактерий в легочной ткани, потому что в таком состоянии бактерии устойчивы к эрадикации фагоцитами и их элиминации при лечении антибиотиками (минимальная ингибирующая концентрация антибиотика увеличивается при этом в ≥ 100 раз) [23].

При учете посева материала на элективные питательные среды было установлено, что микроорганизмы в клиническом материале встречаются в ассоциациях. При этом доминирующими микроорганизмами у больных с тяжелым течением являются *P. aeruginosa* — у 51 больного ребенка (30,5%), *Bcc* — у 48 (28,7%), *S. aureus* — у 89 (53,3%) и *Achromobacter spp.* — у 15 (9%), грибы рода *Candida* — у 96 (57,5%). При этом у 21 пациента грибы были обнаружены только при вторичном посеве после антибиотикотерапии (что еще раз доказывает появление грибов после антибиотикотерапии). Микроорганизмы почти в 100% случаях встречались в ассоциациях.

***Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк)**

Для выделения *S. aureus* из клинического материала рекомендуется использовать одну из селективных сред — ЖСА, маннит-солевой агар или хромогенный агар для *S. aureus*. Для идентификации данного микроорганизма рекомендуется использовать наличие характерных для него признаков: пигмента, лецитиназной активности, плазмокоагулазы, ДНКазы, ферментацию или окисление маннита [24]. Коагулаза (*coagulase*) — это фермент, образуемый определенными видами микроорганизмов рода *Staphylococcus*, который вызывает свертывание плазмы крови. Коагулазу продуцируют также *S. intermedius* и *S. hyicus*, которые редко присутствуют в клиническом материале. Для идентификации *S. aureus* рекомендуется проводить тест латекс-агглютинации диагностическими наборами [24].

У больных МВ встречаются атипичные формы *S. aureus*, которые трудно выделять и идентифицировать общепринятыми методами благодаря их замедленному росту и нетипичным для стафилококков свойствам. Такие атипичные формы называют штаммами с фенотипом SCV. Бактерии медленно растут, в итоге через 48 ч роста формируются очень маленькие, без пигмента и гемолиза,

колонии. Они имеют фенотип *fried-egg* («яичницы-глазуньи») или точечный, редко — мукоидный фенотип. SCV-стафилококки имеют также другие атипичные, не присущие метаболически нормальным стафилококкам свойства. Могут быть лецитиназоотрицательными, слабо коагулазоположительными, характеризоваться отсутствием фермента маннитола, ауксотрофными по гемину, тимидину и менадиону, а также возможностью возврата в родительскую форму. Часто ассоциируются с персистентной инфекцией и обладают резистентностью к антибиотикам [25]. По данным С. Gómez-González et al., распространенность SCV *S. aureus* в клинических экземплярах составляет приблизительно 1%, а среди больных МВ — до 17%. SCV *S. aureus* может часто высеваться от пациентов, которые получали гентамицин или другие аминогликозиды [26]. Часто золотистый стафилококк может не идентифицироваться при смешанных инфекциях с *P. aeruginosa*: длительный рост *S. aureus* в присутствии экзопродукта 4-гидрокси-2-гептилхинолон N оксид бактерий *P. aeruginosa*, ингибирующего рост стафилококков, приводит к образованию SCV. Также высеваются у больных, длительно получающих триметоприм/сульфаметоксазол. Чаще SCV выделяется из нижних дыхательных путей больных МВ старших возрастных групп в ассоциации с *P. aeruginosa* [27].

При этом разные модели инфекции на животных показывают различный уровень вирулентности SCV по сравнению с типичным *S. aureus*. Моделирование септического артрита на мышцах показывает, что SCV более вирулентны, чем типичные стафилококки. Модель эндокардита на кроликах не подтвердила различие вирулентности у типичных и SCV-стафилококков. На модели *Caenorhabditis elegans* было показано, что SCV менее вирулентны, чем первичные родственные изоляты [26].

Лабораторная диагностика, определение чувствительности к антибиотикам атипичных форм *S. aureus* может иметь существенное значение для выбора тактики антимикробной терапии стафилококковой инфекции у больных МВ.

При выделении штаммов с SCV-фенотипом необходимо подтвердить принадлежность к виду *S. aureus* с использованием молекулярно-генетических методов (ПЦР).

Другим важным моментом в диагностике стафилококковой инфекции является идентификация метициллинрезистентных стафилококков (MRS), среди которых особый интерес представляют MRSA.

С клинической точки зрения важно дифференцировать штаммы, имеющие ген *MecA*, который обуславливает резистентность ко многим антибиотикам, от штаммов с другими редко встречаемыми механизмами резистентности. При стафилококковых инфекциях, вызванных штаммами, характеризующимися наличием гена *MecA*, терапия β-лактамами антибиотиками (пенициллинами, цефалоспоридами, карбапенемами) неэффективна. Исключением яв-

ляются анти-MRSA-цефемы (цефтобипрол и цефтаролин). Кроме того, эти штаммы часто бывают резистентны практически ко всем другим классам антибиотиков, за исключением гликопептидов (ванкомицин, тейкопланин).

Резистентность к оксациллину можно объяснить гиперпродукцией β-лактамазы BOR-SA (*borderline S. aureus*), или новой, модифицированной, способностью связывания пенициллина (MOD-SA), или наличием гена *MecC*, т. е. нового варианта гена *MecA*, идентичность которого с *MecA* составляет ≈ 70%.

Поскольку способность формирования биопленок является свойством штаммов, которые могут вызывать хроническую инфекцию, используют дополнительные методы, которые позволяют охарактеризовать способность штаммов формировать биопленки. По способности формировать биопленки выделяют три группы: I — обладающие выраженной способностью к формированию биопленки; II — с умеренной способностью образовывать биопленки; III — с низкой способностью или отсутствием способности формирования биопленки. При исследовании 106 изолятов, выделенных от больных МВ, у 16 штаммов (16,9%) наблюдали выраженную способность к формированию биопленки, у 54 (57,2%) — умеренную, у 36 (38%) — низкую.

Основным экзополисахаридом, продуцируемым *S. aureus* и *S. epidermidis*, с помощью которого происходит межклеточное взаимодействие при образовании биопленок, является полисахарид межклеточной адгезии (PIA), также известный как поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG). Синтез PIA/PNAG кодируется *ica*-опероном, состоящим из 4 генов: *icaA*, *icaB*, *icaC* и *icaD* [27]. Ключевыми продуктами являются трансмембранные протеины IcaA и IcaD, которые участвуют в синтезе PNAG.

Способность микроорганизмов образовывать биопленки препятствует эффективной антибиотикотерапии [29], так как в составе биопленки бактерии обладают устойчивостью в 100–1 000 раз выше к действию антибиотиков.

В течение хронической инфекции легких наблюдается изменчивость чувствительности изолятов к антибиотикам. Как показали результаты молекулярно-генетического исследования изолятов, выделенных в динамике, изменчивость связана с микроэволюционными процессами, происходящими в бактериях при персистенции — приобретением или потерей мобильных генетических элементов, имеющих в своем составе гены резистентности к антибиотикам. Изменчивость может быть обусловлена фенотипической гетерогенностью, которая является результатом адаптации микроорганизма при персистенции. Под воздействием антибиотикотерапии и/или иммунной системы определенные клетки бактерий могут выживать и генерировать субпопуляции с различной резистентностью к антибиотикам. Фенотипическая гетерогенность, различная резистентность к антибиотикам, имеет как

клиническое, так и эпидемиологическое значение, и должна рассматриваться как фактор, ограничивающий эффективность антибиотикотерапии, способствующий выживанию бактерий и формированию хронической инфекции. Этот факт является важным для клиницистов и еще раз подтверждает необходимость исследования антибиотикочувствительности штаммов при назначении антибиотикотерапии и указывает на необходимость применения комбинированной антибиотикотерапии при лечении хронической инфекции легких у больных МВ [29].

При хронической инфекции фенотипическая гетерогенность может быть обусловлена присутствием «гипермутабельного» фенотипа, т. е. клеток бактерий, имеющих повышенную частоту мутаций (от 10^{-6} до 10^{-7}), в отличие от нормальных клеток, вероятность мутаций которых составляет до 10^{-9} .

Таким образом для точной идентификации видов стафилококков необходимо использовать комплекс бактериологических, биохимических, молекулярно-генетических методов.

***Haemophilus influenzae* (гемофильная палочка)**

Для роста *H. influenzae* обязательным условием является наличие в среде X и V факторов. Также инкубация посевов должна проводиться в условиях с повышенным содержанием CO_2 (5–10%) в течение 48 ч. Для улучшения выделения *H. influenzae* из клинического материала рекомендуется использовать шоколадный агар [24]. Для селективного выделения *H. influenzae* могут быть использованы питательные среды, содержащие бацитрацин (300 мкг/мл). Вместо содержащих антибиотик сред могут быть использованы диски с бацитрацином (10 ЕД). Для чистой культуры *H. influenzae* характерно наличие специфического «мышинного» запаха. Идентификацию *H. influenzae* рекомендуется проводить в соответствии с методическими рекомендациями «Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *H. influenzae*» [30].

Неферментирующие грамотрицательные бактерии

Среди микроорганизмов, вызывающих инфекцию у больных МВ, значительное место занимают НГОБ, общими признаками которых являются: природная устойчивость ко многим антибиотикам, высокая резистентность к дезинфектантам и распространение в больничных стационарах от больного к больному через руки и выделения медицинского персонала. НГОБ принадлежат к нескольким родам и условно могут быть разделены: 1) на оксидазоположительные – роды *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Moraxella*, *Stenotrophomonas*, группа бактерий WO-1 (*weak oxidizer*) со слабой оксидазной активностью, группа 2 *Pseudomonas*-подобных бактерий; 2) оксидазоотрицательные – род *Acinetobacter*, виды *Chryseomonas luteola* и *Flavimonas oryzihabitans* [17, 31].

***Pseudomonas* spp.**

Род *Pseudomonas* (*sensu stricto*) включает множество видов, среди которых наиболее часто встречаются *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. veronii*, *P. monteilii*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. alcaligenes*, *P. luteola*, *P. oryzihabitans*.

Наиболее значимым возбудителем легочных инфекций является *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa хорошо растет как на неселективных, так и на селективных (агары Мак-Конки и Эндо, цетримидный агар) питательных средах при инкубации в обычной атмосфере при 35 °С от 24 до 48 ч [24].

Типичные изоляты *P. aeruginosa* идентифицируют по следующим свойствам: наличие металлического блеска, пигментообразование, положительный тест на оксидазу, рост при 42 °С, характерный земляничный запах, подвижность. Помимо типичных плоских вариантов колоний *P. aeruginosa* существуют другие морфотипы: мукоидные и фенотип мелких колоний (SCV). Такие атипичные штаммы высеваются при хронической синегнойной инфекции, например, от пациентов с МВ. Такие штаммы могут быть неподвижными, терять пигмент и иметь замедленную оксидазную реакцию. Поэтому для подтверждения идентификации могут потребовать постановки дополнительных тестов, идентификации с помощью MALDI-TOF и молекулярно-генетических методов (ПЦР) [32–34].

При исследовании образцов мокроты больных МВ были выделены атипичные фенотипы: мукоидный фенотип имели 26% штаммов *P. aeruginosa*, SCV – 10% штаммов. Мукоидные штаммы при хронической инфекции резистентны к защитной системе организма и лечению антибиотиками, что обусловлено наличием таких факторов патогенности, как альгинат и рамнолипид. Продукцию таких факторов регулирует система *quorum sensing*, которая помимо синтеза ряда факторов патогенности отвечает за образование биопленки [35]. Установление хронической инфекции происходит благодаря образованию биопленок и адаптации в легких больных МВ штаммов: штаммы переходят в мукоидную форму, становятся гипермутабельными и, соответственно, резистентными к антибиотикам [36]. Поэтому дополнительными методами исследования хронической синегнойной инфекции у пациентов с МВ могут быть изучение способности образовывать биопленку и выявление гипермутабельных штаммов.

Исследование изолятов от пациентов с МВ показало, что 7% штаммов от детей и 13% штаммов от взрослых были гипермутабельными. Способностью образовывать биопленки обладали 66%.

Мониторинг хронической инфекции легких у больных МВ показал возможность персистенции нескольких фенотипов *P. aeruginosa* у одного пациента. Изоляты синегнойной палочки, выделенные из одного образца мокроты больного, различались по пигменту, продукции альгината, способности образовывать биопленки и антибиотикорезистентности [32].

Achromobacter spp.

Achromobacter spp. — оппортунистический патоген, грамотрицательные, неспорообразующие мелкие палочки, оксидазо- и каталазоположительные НГОБ. Хорошо растут на простых питательных средах в обычной атмосфере при температуре от 30–37 °С от 48 до 72 ч [24].

В настоящее время род *Achromobacter* характеризуется наличием более 20 видов, среди которых наиболее часто выявляются: *A. xylosoxidans*, *A. denitrificans*, *A. piechaudii*, *A. ruhlandii*, *A. spanius*, *A. insolitus*, *A. marplatensis*, *A. animicus*, *A. mucicolens*, *A. pulmonis*, *A. spiritinus*, *A. aegrifaciens*, *A. anxifer*, *A. dolens*, *A. insuavis*, *A. sediminum*, *A. agilis*, *A. deleyi*, *A. kerstersii*, *A. pestifer*.

Является одним из доминирующих возбудителей при хронической легочной инфекции у больных с муковисцидозом. Согласно последним данным, наиболее часто выделяется *A. ruhlandii*, второй по частоте встречаемости *A. xylosoxidans*. Очень часто *Achromobacter spp.* ложно диагностируют как *B. cepacia complex* в связи с фенотипическим сходством с *B. cepacia complex* при культивировании на 5%-ном кровяном агаре и ростом на BCSA — селективной для *Bcc* среде. Идентификацию до рода рекомендуется проводить фенотипическими методами на коммерческих тест-системах. Видовую идентификацию можно проводить с помощью MALDI-TOF. Надо отметить, что достоверная идентификация бактерий рода *Achromobacter* до вида с помощью MALDI-TOF затруднена: в нашем исследовании несколько штаммов *A. ruhlandii* были ошибочно идентифицированы как *A. xylosoxidans*, что было установлено молекулярно-генетическими методами. Похожие результаты приводят также *E.R. Rodrigues et al.* при сравнении молекулярных методов идентификации во время исследования штаммов *Achromobacter spp.* [37]. Достоверная идентификация *Achromobacter spp.* до вида возможна только с использованием молекулярно-генетических методов исследования, а именно амплификацией и секвенированием специфических генов *nrda765*, *gltB*, *blaOXA* и MLST (мультилокусным секвенированием) [38, 39].

Burkholderia cepacia complex

B. cepacia complex (Bcc) — это группа грамотрицательных, неспорообразующих бактерий. В мазках, окрашенных по Граму, эти микроорганизмы представляют собой полиморфные прямые грамотрицательные палочки размером 0,5–1,0 × 1,5–5,0 мкм. После культивирования на 5%-ном кровяном агаре при 30 °С в течение 48 ч бактерии *Bcc* образуют серые гладкие колонии с ровными краями размером 1–2 мм с резким характерным запахом гнили. При наличии пигмента колонии могут быть окрашены в желтый цвет различной интенсивности.

В настоящее время вид *B. cepacia sensu lato (B. cepacia complex)* включает 25 близкородственных

видов: *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. pyrrocinia*, *B. anthina*, *B. ubonensis*, *B. latens*, *B. diffusa*, *B. arboris*, *B. seminalis*, *B. metallica*, *B. contaminans*, *B. lata*, *B. pseudomultivorans*, *B. stagnalis*, *B. territorii*, *B. paludism*, *B. puraquae*, *B. orbicola*, *B. sola*, *B. semiarida* [40]. Идентификация *Bcc* является многоэтапной, где необходима комбинация фенотипических и генотипических методов (для идентификации до вида). Бактерии *Bcc* хорошо растут на стандартных питательных средах, таких как агары 5%-ный кровяной, шоколадный, Эндо и Мак-Конки. Но при смешанной инфекции при посеве образцов медленно растущие *Bcc* могут быть не обнаружены на этих средах из-за чрезмерно быстрого роста других микроорганизмов. Поэтому на 1-м этапе для выделения *Bcc* из образца осуществляют посев на селективную среду. Для выделения бактерий комплекса *Bcc* из мокроты наиболее оптимальны агары BCSA и OFPBL (оксидазно-ферментативный полимиксин-бацитрацин-лактозный). На этих средах также могут расти *B. gladioli*, виды *Ralstonia*, *S. maltophilia*, *Achromobacter spp.* и другие микроорганизмы [24]. В связи с этим после выделения бактерий на селективной среде необходимо осуществить их идентификацию с помощью MALDI-TOF, которая точна в определении принадлежности к *Bcc*, но может быть ошибочной при определении вида, и молекулярно-генетических методов (MLST и секвенирование), которые позволяют определить вид бактерий *Bcc*. Использование коммерческих идентификационных тест-систем часто приводит к ошибкам идентификации [33]. Ложная идентификация *P. aeruginosa* или *Bcc* могут иметь нежелательные последствия, ведущие к выбору неправильной терапии и изоляции пациентов.

Например, 2 штамма атипичной *P. aeruginosa* и 2 штамма *A. xylosoxidans* были неправильно идентифицированы API 20NE как *Bcc*, 12 штаммов *Bcc* биохимическими тестами (*LaChema*) были неправильно идентифицированы как другие НГОБ. Около 3,4% штаммов биохимическими тестами не удалось идентифицировать вообще. *D.L. Kiska et al.* показали в своей работе, что точность идентификации НГОБ 4 различных коммерческих тест-систем составляет 57–80%, а точность идентификации *Bcc* — 43–86%. При этом все тесты идентифицировали НГОБ, не являющиеся *Bcc*, как *Burkholderia cepacia complex* [41]. *Wellinghausen et al.* сравнивали результаты идентификации с помощью API 20NE 88 грамотрицательных оксидазоположительных палочек с результатами секвенирования *16S rRNA* [34]. Точность идентификации составляла 17%. В связи с этим методы, основанные на амплификации генов и секвенировании, могут быть незаменимыми в сложных ситуациях.

В последнее время для точной идентификации используют метод MALDI-TOF, а также мультилокусное секвенирование и полное секвенирование генома.

Микобактерии

Микобактерии (*Mycobacterium*) – род аэробных грамположительных медленно растущих кислотоустойчивых палочкообразных бактерий, содержащий большое количество сапрофитных и болезнетворных видов. Включает в свой состав большое число видов (> 140), которые могут быть объединены в комплексы и группы, например *Mycobacterium tuberculosis complex* (МБТК), *Mycobacterium avium complex* и др.

Нетуберкулезные микобактерии (НТМБ) и МБТК характеризуются медленным ростом на питательных средах от 4–7 суток до 10 нед. При подозрении на наличие микобактерий рекомендуется производить окраску препаратов мокроты методом Циля–Нильсена. Для точной постановки диагноза обязательным является выделение штаммов микобактерий и дальнейшая видовая идентификация с использованием молекулярно-генетических методов.

В случае выявления кислотоустойчивых микроорганизмов в микроскопических препаратах, окрашенных по Цилю–Нильсену, все дальнейшие исследования для выявления и идентификации микобактерий необходимо проводить в специализированных лабораториях, оснащенных современным оборудованием и соответствующими диагностическими тестами.

После разжижения мокроты и центрифугирования из осадка производят высевы на яичную среду (Левенштейна–Йенсена) или агаровую основу (среда Миддлбука 7Н10). Селективные среды содержат ингредиенты, тормозящие рост сопутствующих бактерий и грибов. Инкубацию проводят во влажной атмосфере с содержанием 8–12% CO₂. Образцы можно инокулировать в жидкую среду с ¹⁴C-пальмитиновой кислотой с добавлением или без антимикробных агентов, используя радиометрический метод и аппарат ВАСТЕС 480ТВ. Чувствительность этого метода достигает 10 КОЕ/мл. Для получения роста МБТ на первичных средах требуются 3–5 нед. инкубации, затем еще 1–2 нед. для подтверждающего ниаинового теста и определения чувствительности к анти-туберкулезным препаратам. В среднем исследование с применением радиометрического метода занимает 18 дней, обычным методом – 36 дней [42].

Используется также молекулярно-генетический метод – выявление ДНК *M. tuberculosis* в биологическом материале. Для *M. tuberculosis* молекулярно-генетическое определение устойчивости к рифампину и изониазиду имеет важное диагностическое значение.

Аэробные актиномицеты

Аэробные патогенные актиномицеты включают роды *Nocardia*, *Streptomyces*, *Actinomadura* и *Rhodococcus*, *Micromonospora*, *Micropolyspora*, *Thermoactinomyces* и *Saccharomonospora*. Они вызывают пневмониты (альвеолиты) и хорошо растут (в течение 3–7 дней) на простых бактериальных и грибковых средах при 50 °С во влажной атмосфере. Однако у рода *Nocar-*

dia для роста колоний может потребоваться 3 нед. инкубации. Идентификацию актиномицет проводят по морфологическим признакам колоний, микроскопическому строению микроорганизмов, способности гидролизовать различные субстраты, взаимодействию чистых культур с антителами в серологических реакциях.

Диагностика грибов

Лабораторную диагностику пневмомикозов проводят культуральным, гистологическим, серологическими и молекулярно-генетическими методами. Для посева используют картофельные среды, сабуро-декстрозный агар, агар на сердечно-мозговой вытяжке, также селективные среды, содержащие хлорамфеникол и гентамицин, иногда с добавлением циклогексимида, подавляющего рост быстро растущей плесени и ингибирующего *C. neoformans*, *Aspergillus fumigatus* и некоторые виды *Candida*. В отличие от бактерий, которые культивируют при 35 °С, посевы грибов инкубируют при 30 °С.

Грибы рода *Candida* часто обнаруживают в БАЛ, но они редко бывают истинными возбудителями инфекций нижних дыхательных путей. При исследовании аутопсийной ткани легких гистологическое подтверждение кандидоза было выявлено лишь у 2% онкологических больных и у 0,5% пациентов без неопластических процессов. Определение кандидозного антигена непосредственно в сыворотке крови или клинических образцах мало помогает в диагностике локального или диссеминированного кандидоза, поскольку чувствительный метод иммуноферментного анализа (ИФА) выявляет присутствие антигенов и антител у здоровых и у 50–75% больных при диссеминированном кандидозе [43, 44].

Инвазивный легочный аспергиллез встречается чаще, чем легочный кандидоз, в 90% наблюдений выделение аспергилл из мокроты и бронхиального смыва связано с колонизацией НДП [45]. В то же время при подтвержденном инвазивном легочном аспергиллезе лишь у 10% больных из мокроты были выделены *Aspergillus spp.* Для правильной интерпретации результатов культуральной диагностики необходимо производить посевы 2 образцов, полученных при транстрахеальной легочной биопсии и методом защищенной щеточной биопсии [46]. Для ранней диагностики инвазивного легочного аспергиллеза может быть полезным обнаружение аспергиллезного антигена в сыворотке крови методом ИФА, чувствительность которого варьируется в пределах 60–100% в разных группах больных [47].

Выделение *C. neoformans* из респираторного тракта следует трактовать с осторожностью, так как в половине наблюдений у пациентов отсутствуют признаки поражения паренхимы легких, рентгенологические изменения и другие симптомы заболевания. Это свидетельствует лишь о колонизации грибами [48]. В подтверждении диагноза «криптококкоз» помогает обнаружение криптококкового антигена

в сыворотке крови и ликворе. Антиген можно определять также в плевральном выпоте и БАЛ [49].

Неопределенность в оценке положительных и отрицательных результатов посевов при диагностике оппортунистических грибковых инфекций возрастает у больных иммунодефицитами. Существует 2 наиболее достоверных критерия прижизненной диагностики таких инфекций:

- 1) обнаружение грибов в ткани легких при культуральном или гистологическом исследовании;
- 2) выделение культуры при посеве ликвора или других стерильных биологических жидкостей, исключая кровь и мочу, которые могут быть контаминированы, в т. ч. при заборе материала [50].

В отличие от оппортунистических возбудителей пневмоцистозов, выделение патогенных диморфных грибов *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* и *Sporothrix schenckii* из респираторных образцов, ткани легких и биоматериалов других локализаций имеет несомненную клиническую значимость. Эти грибы существуют в мицелиарной и дрожжевой (или в виде сферул) формах. В среднем их рост на средах появляется через 14 дней (грибов рода *Candida* — через 1–3 дня, *Aspergillus spp.* — через 4–7 дней). В рутинной практике посевы инкубируют до 4 нед. у пациентов при серологически подтвержденной грибковой инфекции или у больных, получавших антигрибковую терапию при неустановленной этиологии инфекционного процесса. Присутствие орофарингеальной микрофлоры в респираторных образцах не препятствует интерпретации результатов посевов на диморфные грибы. Посевы осуществляют при отрицательных результатах прямой микроскопии окрашенных препаратов, в т. ч. специальными методами, где можно легко идентифицировать соответствующий возбудитель по характерной морфологии. При диссеминированной грибковой инфекции исследуют материалы из других анатомических областей. Например, при генерализованном гистоплазмозе прямая микроскопия окрашенных мазков костного мозга помогает быстро поставить диагноз у 50% больных, положительный посев обнаруживается в 84% наблюдений [51]. Дополнительный диагностический тест — обнаружение полисахаридного антигена *H. capsulatum* в моче методом ИФА у 90% больных, однако этот тест может быть положительным и у пациентов с диссеминированной инфекцией, вызванной *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis*, *Penicillium marneffeii* [52].

Лабораторная диагностика **пневмоцистоза** (пневмоцистной пневмонии) является сложной задачей из-за отсутствия систем культивирования (описанные в научной литературе методы дороги и зачастую невозможны) и невозможности получить и накопить культуру *P. jirovecii* вне легких живого организма. Для диагностики пневмоцистоза необходимо использовать комплекс методов. Этиологическая лабораторная диагностика включает визуальное выявление возбудителя при использовании микроскопии,

обнаружение его антигенов или ДНК, определение специфических АТ к *P. jirovecii* (*carinii*).

Микроскопические методы основаны на визуализации грибка с помощью цитохимического окрашивания и специфических методах окрашивания с использованием моноклональных антител для выявления антигена *P. jirovecii* (*carinii*) (метод иммунофлюоресценции). Материалом служат мазки, мазки-отпечатки препаратов различного биологического материала: мокроты, индуцированной мокроты, БАЛ, биоптатов, у детей раннего возраста — аспираты из трахеи, смывы и мазки из ротоглотки.

Иммунологические методы, выявляющие специфические антитела — иммуноглобулины (Ig) G и M к *P. jirovecii*, также играют важную роль в диагностике пневмоцистоза. Такие методы особенно ценны при эпидемиологических исследованиях, при оценке течения латентной инфекции и при диагностике, когда у больного невозможно взять лаважную жидкость или мокроту. Для определения IgG и IgM к *P. jirovecii* используют реакцию непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) и ИФА. Определение антител проводят с интервалом 14 дней. Четырехкратное нарастания титра/уровня IgG или выявление IgM к *P. jirovecii* свидетельствуют об остром инфекционном процессе. Обнаружение только IgG без нарастания указывает на наличие анамнестических антител.

В комплексной диагностике необходимо использовать также молекулярно-генетические методы, т. е. выявление ДНК *P. jirovecii* в БАЛ и индуцированной мокроте. Однако качественный метод обнаружения ДНК не является однозначным доказательством болезни, а может свидетельствовать о носительстве. В связи с этим перспективно определение концентрации ДНК *P. jirovecii* в образцах при диагностике пневмоцистоза с помощью количественной ПЦР в реальном времени [53].

Диагностика хламидий

У детей хламидийную пневмонию, вызванную *Chlamydia trachomatis*, можно диагностировать с помощью реакции иммунофлюоресценции (РИФ), а также культуральным и серологическими методами. Для посева обычно используют гетероплоидные мышинные клетки Мак-Кой, обработанные циклогексимидом. Их инкубируют 40–72 ч, после чего исследуют наличие внутриплазматических включений хламидий при световой микроскопии после окрашивания иодином гликогена, продуцируемого хламидиями в инфицированных клетках. Более быстрый и чувствительный метод — РИФ при окраске культур клеток моноклональными антителами.

C. psittaci не продуцирует гликоген, и ее внутриплазматические включения выявляют при окраске по Гимзе обычно после 5–10 дней инкубации. Поскольку клеточные культуры *C. psittaci* высокоинфекционные, метод культивирования используется редко, и диагноз пситтакоза устанавливают серологическими методами.

S. pneumoniae можно обнаружить при заражении респираторными образцами монослоя культуры клеток HeLa-229. После инкубации в течение 3–5 дней готовят окрашенные специфическими моноклональными антителами препараты и изучают методом РИФ.

Диагноз хламидийной пневмонии ставят с помощью серологических методов при определении антител. Однако у больных иммунодефицитами, неспособными синтезировать антитела в достаточном количестве, может потребоваться культуральное исследование или использование молекулярно-генетических методов (ПЦР в режиме реального времени). Из 2 видов хламидий *C. trachomatis* – редкий возбудитель внебольничной пневмонии у больных с иммунодефицитами.

Определение чувствительности хламидий к антибиотикам не имеет существенного значения, так как различия между штаммами и появление новой резистентности весьма редки, а сами методы определения не стандартизированы и используются в основном с научной целью [1, 54, 55].

Диагностика микоплазм

Среды для культивирования микоплазм содержат свежий дрожжевой экстракт, пептон, сыворотку животных и готовятся как двухфазная среда с агаровой основой, залитой бульоном, содержащим индикатор рН для контроля ферментации глюкозы, бензилпенициллин и ацетат таллия для подавления роста бактерий. Другие добавки включают амфотерицин В и полимиксин. В процессе инкубации посевов наблюдают появление помутнения среды в течение 4–6 дней, после чего производят первый высев на селективный агар, затем повторный высев на 8–12-й день. Рост типичных колоний обычно виден в конце 2-й нед. инкубации. При отсутствии роста двухфазную среду инкубируют до 30 дней, после истечения этого периода выдают отрицательный результат. Разрешающая способность культурального метода – 10^5 КОЕ/мл, при прямом определении антигена в респираторном секрете методом ИФА – 10^4 КОЕ/мл. Из-за медленного роста организмов и низкой чувствительности культурального метода (60%) для диагноза инфекции *M. pneumoniae* чаще используют определение специфических антител или ДНК-амплификационный тест, а также ПЦР в реальном времени [1, 54, 55].

Чувствительность микоплазм к антимикробным препаратам определяют только в научных целях и при изучении новых препаратов. Как и хламидии, микоплазмы предсказуемо чувствительны к тетрациклам, макролидам, кетолидам и фторхинолонам.

Диагностика вирусов

Для заражения вирусами используют различные культуры клеток. Возникновение инфекции определяют по цитопатическому эффекту или появлению гемагглютинирующих антигенов. Дополнительные тесты (гемадсорбции, ингибиции гемагглютинации,

нейтрализации и иммунофлюоресценции) используют для дифференциации вирусов гриппа и парагриппа. Культуральный метод при изучении респираторных образцов более чувствителен, чем определение антигенов, и занимает в среднем 3–4 дня для обнаружения цитопатического эффекта при вирусе гриппа А и 8–9 дней – при ЦМВ.

Выделение вирусов гриппа, парагриппа, респираторно-синцитиального (РС) и риновирусов из респираторных образцов и ткани легкого имеет одинаково важное клиническое значение, в отличие от аденовирусов, вирусов простого герпеса и ЦМВ – их обнаружение в респираторных образцах не столь существенно, как в ткани легкого [1, 54, 55].

Чтобы выявить нуклеиновые кислоты вирусов гриппа А, В и вызывающих острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), используют тест-системы, основанные на методе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Используемые методы позволили определить, что среди основных возбудителей ОРВИ преобладают вирусы гриппа, возбудители парагриппа, респираторно-синцитиальной (РС) и риновирусной инфекции, важную роль играют аденовирусы. Эти методы позволяют анализировать особенности эпидемических сезонов, интенсивности и длительности циркуляции различных вирусов гриппа и ОРВИ [56].

Для идентификации респираторных вирусов используют ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Такие исследования позволяют проводить анализ заболеваемости ОРВИ.

Было проведено исследование, включающее выявление нуклеиновых кислот 17 видов респираторных вирусов: РНК риновирусов, ДНК аденовирусов, РНК коронавируса человека (229Е, ОС43, НКUI, NL63), ДНК бокавируса, РНК респираторно-синцитиального вируса, РНК метапневмовируса, РНК вирусов парагриппа, РНК вирусов гриппа, РНК коронавируса SARS-CoV-2. Результаты позволили оценить распространенность возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19 среди лиц без симптомов ОРВИ, а также эффективность использования в популяции медицинских масок с целью профилактики данных инфекций. За весь период наблюдения искомые возбудители выявлены у 11,1% обследованных с превалированием риновируса, РНК SARS-CoV-2 обнаружена у 1,66% обследованных, доля остальных вирусов не превышала 1%. Исследование продемонстрировало, что лица без симптомов ОРВИ могут иметь высокую концентрацию РНК SARS-CoV-2 (до 10^{10} копий в 1 мл образца мазка из носо- и ротоглотки), поэтому могут служить опасным источником инфекции, особенно при отсутствии медицинской маски, поскольку для передачи возбудителя воздушно-капельным путем будет достаточно даже кратковременного контакта [57].

Пандемия COVID-19 в 2020 г. внесла свой вклад в эпидемиологию респираторных инфекций. Важна своевременная дифференциальная диагностика

COVID-19 и сезонных острых респираторных заболеваний. У пациентов с новой коронавирусной инфекцией (НКИ) возрастает риск развития госпитальной пневмонии. Актуальным является анализ особенностей циркуляции резистентных к антибактериальным химиопрепаратам штаммов возбудителей внутрибольничных инфекций.

Была изучена этиологическая структура внебольничной пневмонии в период эпидемического распространения COVID-19 и проведена оценка риска пневмонии, связанной с оказанием медицинской помощи. В период распространения НКИ в Ростовской обл. доля положительных результатов на SARS-CoV-2 среди пациентов с диагнозом «внебольничная пневмония» составила 35,6%. Частота микст-инфекций вирусной природы достоверно не различалась среди пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом COVID-19 и пациентов с отрицательным результатом на SARS-CoV-2 (25,9 и 26,2 % соответственно). В структуре микробиоты пневмонии, не обусловленной SARS-CoV-2, преобладали грибы рода *Candida* и плазмокоагулирующие стафилококки. Достоверно чаще у пациентов с лабораторно подтвержденным COVID-19 изолировали культуры неферментирующих грамотрицательных бактерий. У 51,6 % больных, проходивших лечение в стационаре, отмечено вторичное коинфицирование, вероятно, связанное с объектами внешней среды или с передачей инфекции от персонала. Передача инфекции, связанной с медицинской помощью, от пациента к пациенту не установлена [58].

ИФА тест-системы позволяют определять уровень IgG и IgM в сыворотке, что особенно важно для анализа результатов вакцинопрофилактики. В 25 больницах и поликлиниках Москвы было проведено рандомизированное двойное слепое плацебоконтролируемое исследование 3-й фазы. В него вошли участники старше 18 лет с отрицательными результатами ПЦР на SARS-CoV-2 и тестами на IgG и IgM, отсутствием инфекционных заболеваний за 14 дней до включения и отсутствием других прививок за 30 дней до включения. Титр гликопротеин-специфических антител в сыворотке определяли с помощью ИФА. В ИФА определяли IgG, специфичные к рецептор-связывающему домену (RBD) гликопротеина S SARS-CoV-2. Титр нейтрализующих антител измеряли в день 1-й вакцинации и на 42-й день с помощью анализа микронейтрализации, используя SARS-CoV-2 (hCoV-19/Russia/Moscow_PMV-1/2020), в 96-луночном планшете и инфицирующей дозе 50% культуры ткани (TCID₅₀) 100.

Применение молекулярно-генетических методов позволило провести исследование безопасности и эффективности вакцин «Гам-КОВИД-Вак» и «Спутник Лайт» [59–63].

Микроскопический метод

Изучение нативных и окрашенных препаратов, в т. ч. с использованием меченных флюорохромом

специфических антисывороток (антительные диагностикумы), обеспечивает быструю диагностику инфекций НДП.

Морфологию бактерий изучают при значительном увеличении (иммерсионный объектив × 100). По разным оценкам, чувствительность микроскопического метода при окраске по Граму варьируется от 35 до 96%, а специфичность – от 12 до 85% [64]. Его диагностическое значение в основном ограничивается пневмококковой инфекцией, где совпадение с результатами культуральной диагностики составляет 75% [65].

Для выявления *M. tuberculosis* микроскопические методы при окраске мазков по Цилю–Нильсену и флюоресцентным красителем имеют одинаковую чувствительность (до 50%) и специфичность (до 99%) [66]. Для обнаружения МБТ в световом микроскопе при окраске по Цилю–Нильсену необходимо содержание в мокроте не менее 5 000–10 000 КОЕ/мл.

При диагностике **актиномикоза** легких материалом для микроскопического исследования служат гной, мокрота, плевральная жидкость, пунктаты закрытых очагов поражения, биопсийный материал. Обнаружение друз, мицелия, отдельных веточек и цепочек из спор – ценное подтверждение актиномикотической природы болезни. Прямая фазово-контрастная микроскопия бронхиального секрета со смесью 10% раствора гидроксида калия и 10% глицерина позволяет проводить быструю идентификацию грибов *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans* и *Aspergillus spp.* Добавление специальных красителей позволяет улучшить очертания элементов гриба, включая *P. jirovecii*. Для определения антигенов *P. jirovecii* в индуцированной мокроте и БАЛ можно использовать РИФ с моноклональными антителами [67].

Для обнаружения *Legionella pneumophila* непосредственно в мокроте, ТТА, бронхиальном смыве, биоптатах ткани легкого применяется РИФ, чувствительность которой составляет 25–66%, а специфичность достигает 94% [68]. Для постановки диагноза легионеллезной пневмонии положительный результат РИФ требуется подтвердить с помощью любых других методов, таких как культуральное исследование респираторных образцов, определение антигена в моче или серологические реакции с сывороткой крови больного.

РИФ позволяет диагностировать инфекции, вызванные РС-вирусом, вирусами гриппа А и В, парагриппа, аденовирусами, вирусом кори, что особенно важно в случаях, когда обычная вирусологическая технология трудоемка или недоступна.

Методы выявления антигенов

Определение антигенов широко используется для диагностики различных инфекций, что связано с возможностью быстрого получения результатов и идентификации некультивируемых возбудителей. Однако для правильного диагноза одного метода не-

достаточно. Надежность теста в большей степени зависит от того, может ли возбудитель быть комменсалом (как в случае с *S. pneumoniae*), или его наличие всегда свидетельствует об инфекции (например, *L. pneumophila*) [69].

Для индикации антигенов *S. pneumoniae* в мокроте, сыворотке крови и моче были разработаны методы встречного иммуоэлектрофореза, коаггутинации, латекс-агглютинации, ИФА. Их чувствительность варьировалась от 40 до 90% [70, 71].

При диагностике легионеллезной пневмонии рекомендованы ИФА и радиоиммунологический метод для выявления в моче антигенов *L. pneumophila* серогруппы 1, на долю которой приходится 70–90% всех наблюдений данного заболевания. Чувствительность достигает 70–100%, специфичность – более 99% [72, 73]. Разработан иммунохроматографический тест для определения легионеллезного антигена в моче.

При криптококкозе определяют наличие антигена *Cryptococcus neoformans* в БАЛ, плевральном экссудате, сыворотке крови и ликворе [73]. При аспергиллезе используют ИФА для выявления в сыворотке крови белкового антигена (галактоманна), превалирующего в клеточной стенке *Aspergillus spp.* [7]. При легочном бластомикозе в сыворотке крови, моче и БАЛ можно выявить антиген *Blastomyces dermatidis* у 70–100% больных в зависимости от формы инфекции (локализованная или генерализованная) [74].

В назофарингеальном аспирате, лаважной жидкости и мокроте в инфицированных эпителиальных клетках с помощью РИФ и ИФА можно быстро обнаружить антигены вирусов гриппа, парагриппа, аденовирусов, ЦМВ в ранние сроки заболевания.

Серодиагностика

Серодиагностика основана на выявлении специфических антител разных классов (IgM, IgA, IgG) в сыворотке крови у инфицированных пациентов и определении их титров при однократном исследовании или в динамике заболевания (в парных сыворотках, взятых с интервалом 10–14 дней) с помощью антигенных диагностикумов в различных серологических реакциях *in vitro*. Обычно используются реакции преципитации, агглютинации, встречного иммуоэлектрофореза, ИФА, непрямой иммунофлюоресценции, реакции связывания комплемента (РСК). Эти методы имеют основное значение при подтверждении диагноза и проведении эпидемиологических исследований. Известны коммерческие наборы на основе ИФА и реакции непрямой иммунофлюоресценции для определения IgM и IgG к широкому кругу респираторных патогенов: *Legionella spp.*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *M. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *C. psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*, *Strongiloides stercoralis*, вирусов гриппа, парагриппа, РС-вирусов, аденовирусов, ТОРС-коронавирусов, вирусов простого герпеса, ЦМВ, вирусов краснухи и оспы, Эпштейна–Барр.

Для диагностики инфекции, вызванной *S. pneumoniae*, обычно используется метод микроиммунофлюоресценции. Результат считается положительным при 4-кратном увеличении титра антител в парных сыворотках или при однократном определении титра IgM $\geq 1 : 16$ или IgG $\geq 1 : 512$ [75]. Аналогичные критерии применяются для *C. psittaci*. Чувствительность микроиммунофлюоресценции составляет 39–100%, специфичность – 94–100%, что превышает эти показатели в РСК и ИФА, применение которых при серодиагностике инфекций НДП хламидийной этиологии считается нецелесообразным. При неонатальной пневмонии, вызванной *C. trachomatis*, титр видоспецифических IgM 1 : 32 диагностический и коррелирует с результатами культуральной диагностики. В то же время определение IgG малоинформативно из-за циркуляции материнских антител у детей в возрасте до 1 года.

Ввиду низкой чувствительности культурального метода серологические тесты составляют основу диагностики микоплазменной инфекции. Холодовые агглютинины, выявляемые в реакции агглютинации с резус-отрицательными эритроцитами 0(I) группы крови при 4 °С, присутствуют приблизительно у 50% больных пневмонией, обусловленной *M. pneumoniae*. Их уровень приходит в норму через 6 нед. после острой инфекции. Однако холодовые агглютинины могут образовываться при целом ряде вирусных инфекций, лимфомах, аутоиммунных нарушениях, что снижает их диагностическую ценность. Комплемент-связывающие антитела выявляют в РСК у 85% пациентов, что согласуется с результатами культурального метода. При этом важны 4-кратное нарастание титров антител либо титр $\geq 1 : 80$ при однократном исследовании сыворотки. В последние годы получил развитие метод ИФА для выявления специфических микоплазменных IgM и IgA; его чувствительность и специфичность выше, чем РСК [75]. IgM обнаруживаются на 1-й нед. заболевания и достигают пика на 3-й нед.; у взрослых они продуцируются нерегулярно, поэтому отрицательный результат не исключает наличия инфекции. IgA более постоянны, их продукция не зависит от возраста пациентов.

Серодиагностика грибковых инфекций не всегда информативна. Определение антител к *C. albicans* не позволяет провести дифференциальную диагностику локализованного и диссеминированного кандидоза, так как эти антитела присутствуют и у больных, и у здоровых пациентов и только в 50–75% наблюдений встречаются при диссеминированном кандидозе [67].

РСК для выявления антител к *B. dermatidis* характеризуется низкой чувствительностью и специфичностью (25%), титр антител может повышаться при инфекциях, вызванных *C. immitis* и *H. capsulatum*. Иммунодиффузионный тест для выявления антител к *B. dermatitidis* более чувствительный и специфичный (40–70%), чем РСК. Однако и отрицательный результат не исключает диагноз бластомикоза.

При серодиагностике криптококкоза используют реакцию преципитации для определения IgM, которые обнаруживают на 2–3-й нед. заболевания у 75% больных, затем постепенно исчезают [45]. Комплемент-связывающие IgG появляются позднее, их титр $\geq 1 : 32$ предполагает возможность диссеминированной инфекции.

При легочном гистоплазмозе у 90% больных определяются антитела к *H. capsulatum* посредством РСК и методом иммунодиффузии, при диссеминированном процессе они встречаются в 80% наблюдений [76]. Перекрестные реакции наблюдаются при бластомикозах, кокцидиоидомикозе и параккокцидиоидомикозе.

Молекулярно-генетические методы

Основу молекулярно-генетических методов составляют ПЦР, ее модификации и секвенирование. Принцип ПЦР заключается в многократном повторении (амплификации) исследуемых локусов нуклеиновых кислот термостабильной полимеразой для наработки достаточного количества ДНК и обнаружения ее методами электрофореза и гибридизации. Этот процесс достигается с помощью введения в реакционную смесь коротких молекул ДНК (праймеров), комплементарных нуклеотидным последовательностям того микроорганизма, который необходимо обнаружить. Связывание праймеров с соответствующими участками ДНК/РНК приводит к образованию локальной 2-цепочечной структуры узнаваемой полимеразой, которая начинает достраивать ее в направлении 5-3', используя дезоксинуклеозидтрифосфаты, присутствующие в реакционной смеси. Таким образом, если один из праймеров связывается с прямой цепью, а другой – с обратной, происходит наработка продукта, ограниченного с 2 сторон этими праймерами. Поскольку каждый из вновь образованных продуктов – матрица для дальнейшей амплификации, происходит экспоненциальное увеличение их количества.

Анализ полученных продуктов амплификации с помощью электрофореза заключается в разделении ампликонов под действием электрического поля в агарозном или полиакриламидном геле. После окончания электрофореза оцениваются наличие и размер полученных продуктов реакции амплификации. Гибридизация заключается в нанесении на твердую фазу (микропланшет) олигонуклеотидных зондов, комплементарных внутренней структуре исследуемых ампликонов (прямая гибридизация), или в нанесении на твердую фазу полученных ампликонов (обратная гибридизация).

Добавление ампликонов или зондов, меченных либо с помощью радиоактивных меток, либо флуоресцентных, либо конъюгированных с ферментом, способным осуществлять цветовую реакцию (например, пероксидаза хрена), приводит к образованию комплексов, которые можно определять с помощью соответствующих методов. Достоинство гибридиза-

ции, по сравнению с гель-электрофорезом, – увеличение специфичности метода и объективизация оценки результатов эксперимента в автоматическом режиме. К недостаткам относятся трудоемкость, необходимость использования специальной аппаратуры и более высокая стоимость.

Существуют наборы ПЦР для выявления отдельных микроорганизмов – бактерий, вирусов, грибов, простейших (*L. pneumophila*, *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. kansasii*, *H. capsulatum*, *B. dermatidis*, *C. immitis*, *A. fumigatus*, *P. jirovecii*, *T. gondii*, респираторных вирусов, вирусов простого герпеса, ЦМВ, ТОРС-коронавируса, SARS-CoV-2 и др.) и одновременного обнаружения нескольких возбудителей.

Наиболее перспективна мультиплексная ПЦР в реальном времени, позволяющая определять наличие ДНК различных возбудителей в одной пробирке в течение < 3 ч. Принцип основан на непосредственном иммунофлуоресцентном определении амплифицированных генов по мере их генерации *in vitro*. Эффективность подобного подхода была доказана в ряде исследований. Однако требуется осторожность в интерпретации результатов для дифференциации между колонизацией (или латентными формами) и инфекцией. Пневмококки, хламидии, микоплазмы, кандиды, пневмоцисты встречаются у индивидуумов и при отсутствии инфекции. Герпесвирусы, токсоплазмы, пневмоцисты могут существовать в латентной стадии в тканях и не вызывать инфекцию. В настоящее время среди молекулярно-биологических методов для точной идентификации в сложных случаях, для изучения эпидемиологической значимости штаммов микроорганизмов используют методы мультилокусного секвенирования и полного геномного секвенирования.

Некоторые организмы трудно или невозможно выявить другими методами, и молекулярная диагностика становится единственно возможной. Диагностическая специфичность и чувствительность могут достигать 98–100%. К таким методам относится мультилокусное секвенирование, секвенирование 16S *rRNA* и *ITS* (*internal transcribed spacer* – внутренний транскрибируемый спейсер) для идентификации грибов, полное секвенирование генома.

Заключение

Лаборатории клинической микробиологии играют жизненно важную роль в этиологической диагностике инфекций нижних дыхательных путей. Надежность результатов микробиологического исследования зависит от целого ряда условий: правильного получения адекватного материала; своевременной его доставки в лабораторию в соответствующих средах или контейнерах; предварительной обработки образцов в соответствии с задачами исследования; чувствительности и специфичности используемых методов для выявления возбудителя и его маркеров; грамотной трактовки результатов исследования в со-

ответствии с клиническими, радиографическими и другими лабораторными данными пациента. В настоящее время комплекс современных адекватных методов позволяет правильно и быстро идентифицировать возбудителей респираторных инфекций, осуществлять мониторинг хронической инфекции легких, выявлять источник инфекции и назначать необходимую терапию, а также осуществлять профилактические мероприятия.

Литература

1. Зубков М.Н.. Микробиологическая диагностика при легочных заболеваниях. Респираторная медицина. Руководство в 3 томах / Под ред. А.Г. Чу-чалина. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. С. 213–226.
2. Шагинян И.А., Капранов Н.И., Чернуха М.Ю., Алексеева Г.В., Семькин С.Ю., Аветисян Л.Р., Каширская Н.Ю., Пивкина Н.В., Данилина Г.А., Батов А.Б., Бусуек Г.П. Микробный пейзаж нижних дыхательных путей у различных возрастных групп детей, больных муковисцидозом. ЖМЭИ, 2009, № 5, С. 15–20.
3. Чернуха М.Ю., Шагинян И.А., Капранов Н.И. и др. Персистенция *Burkholderia cepacia* у больных муковисцидозом. Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. 2012; 4: 93–98.
4. Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р., Шагинян И.А. и др. Алгоритм микробиологической диагностики хронической инфекции легких у больных муковисцидозом. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2014; 16(4): 276–290.
5. Воронина О.Л., Кунда М.С., Аксенова Е.И. и др. Экспресс-диагностика микроорганизмов поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом. Клин. лаб. диагност. 2013; 11: 53–58.
6. Guss, A., Roeselers, G., Newton, I. et al. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria associated with cystic fibrosis. ISME J 5, 20–29 (2011). <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.88>.
7. Ansorg R, van den Boom R, Rath PM. Detection of Aspergillus galactomannan antigen in foods and antibiotics. Mycoses. 1997 Dec; 40(9–10): 353–357. doi: 10.1111/j.1439-0507.1997.tb00249.x. PMID: 9470421
8. Boersma WG, Löwenberg A, Holloway Y, Kutt-schrütter H, Snijder JA, Koëter GH. Pneumococcal capsular antigen detection and pneumococcal serology in patients with community acquired pneumonia. Thorax. 1991 Dec;46(12):902–6. doi: 10.1136/thx.46.12.902. PMID: 1792638; PMCID: PMC463496.
9. Bradsher RW, Chapman SW, Pappas PG. Blastomycosis. Infect Dis Clin North Am. 2003 Mar; 17(1): 21–40, vii. doi: 10.1016/s0891-5520(02)00038-7. PMID: 12751259.
10. Rosario M, Capeding Z, Nohynek H et al. Evaluation of a new tube latex agglutination test for detection of type-specific pneumococcal antigens in urine. J Clin Microbiol. 1991 Sep; 29(9): 1818–21. doi: 10.1128/jcm.29.9.1818-1821.1991. PMID: 1774301; PMCID: PMC270217.
11. Cook DJ, Fitzgerald JM, Guyatt GH, Walter S. Evaluation of the protected brush catheter and bronchoalveolar lavage in the diagnosis of nosocomial pneumonia. J Intensive Care Med. 1991 Jul-Aug; 6(4): 196–205. doi: 10.1177/088506669100600405. PMID: 10147949.
12. Limaye AP, Babu TM, Boeckh M. Progress and Challenges in the Prevention, Diagnosis, and Management of Cytomegalovirus Infection in Transplantation. Clin Microbiol Rev. 2020 Oct 28; 34(1): e00043–19. doi: 10.1128/CMR.00043-19. PMID: 33115722; PMCID: PMC7920732.
13. Bateman M, Oladele R, Kolls JK. Diagnosing Pneumocystis jirovecii pneumonia: A review of current methods and novel approaches. Med Mycol. 2020 Nov 10; 58(8): 1015–1028. doi: 10.1093/mmy/myaa024. PMID: 32400869; PMCID: PMC7657095.
14. Thambidurai L, Prabhuradhan R, Singhvi P et al. Cryptococcal pneumonia: the great mimicker. BJR Case Rep. 2017 Jan 5; 3(2): 20150358. doi: 10.1259/bjrcr.20150358. PMID: 30363287; PMCID: PMC6159249.
15. Grayston JT. Chlamydia pneumoniae, strain TWAR pneumonia. Annu Rev Med. 1992;43:317–23. doi: 10.1146/annurev.me.43.020192.001533. PMID: 1580592.
16. Russo, A., Tiseo, G., Falcone, M. et al. Pulmonary Aspergillosis: An Evolving Challenge for Diagnosis and Treatment. Infect Dis Ther 9, 511–524 (2020). <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00315-4>
17. Song JY, Eun BW, Nahm MH. Diagnosis of pneumococcal pneumonia: current pitfalls and the way forward. Infect Chemother. 2013 Dec;45(4):351–66. doi: 10.3947/ic.2013.45.4.351. Epub 2013 Dec 27. PMID: 24475349; PMCID: PMC3902818.
18. Kabra SK, Alok A, Kapil A et al. Can throat swab after physiotherapy replace sputum for identification of microbial pathogens in children with cystic fibrosis? Indian J Pediatr. 2004 Jan; 71(1): 21–23. doi: 10.1007/BF02725650. PMID: 14979380.
19. Arsić Arsenijević V, Vyzantiadis TA, Mares M et al. Diagnosis of Pneumocystis jirovecii Pneumonia in Pediatric Patients in Serbia, Greece, and Romania. Current Status and Challenges for Collaboration. J Fungi (Basel). 2020 Apr 17; 6(2): 49. doi: 10.3390/jof6020049. PMID: 32316676; PMCID: PMC7345889.
20. Group. Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working. Laboratory standards for processing microbiological samples from people with cystic fibrosis. Report of the UK Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working Group, September 2010.
21. Чернуха М.Ю., Данилина Г.А., Шагинян И.А. и др. Роль регуляторной системы “*quorum sensing*” в образовании биопленок бактериями *Burkholderia cepacia* и *Pseudomonas aeruginosa*. Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол., 2009; 46 39–43.
22. Чернуха М.Ю., Романова Ю.М., Малеев Г.В. и др. Роль регуляторной системы “*Quorum sensing*” в симбиотическом взаимодействии бактерий *Burkholderia cepacia* и *Pseudomonas aeruginosa* при смешанной инфекции. Журн. микробиол. 2006; 4: 32–37.

23. Шагинян И.А., Данилина Г.А., Чернуха М.Ю. и др. Формирование биопленок клиническими штаммами бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик. Журн. микробиол. 2007; 1: 3-9.
24. Поликарпова С. В., Жилина С. В., Кондратенко О. В. и др. Руководство по микробиологической диагностике инфекций дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом. М.; Твер: Триада, 2019.
25. Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C et al. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. J Clin Microbiol. 2007 Jan;45(1):168-72. doi: 10.1128/JCM.01510-06. Epub 2006 Nov 15. PMID: 17108072; PMCID: PMC1828983.
26. Gómez-González C, Acosta J, Villa J et al. Clinical and Molecular Characteristics of Infections with CO₂-Dependent Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2010 Aug;48(8):2878-84. DOI: 10.1128/JCM.00520-10.
27. Hoffman LR, Déziel E, D'Argenio DA et al. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 26;103(52):19890-5. doi: 10.1073/pnas.0606756104. Epub 2006 Dec 15. PMID: 17172450; PMCID: PMC1750898.
28. de Silva GD, Kantzanou M, Justice A et al. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative *Staphylococci* associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol. 2002 Feb;40(2):382-8. doi: 10.1128/JCM.40.02.382-388.2002. PMID: 11825946; PMCID: PMC153361.
29. Аветисян Л.Р., Медведева О.С., Чернуха М.Ю. и др. Эпидемиологические и микробиологические особенности хронической инфекции легких у больных муковисцидозом, вызванной *Staphylococcus aureus*. Педиатрия, журнал имени Г.Н. Сперанского, том 99, № 2, 2020, 102-111. DOI: 10.24110/0031-403X-2020-99-2-102-111.
30. Кречикова О.И., Козлов Р.С., Богданович Т.М. и др. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae*. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000; 1 (2): 88–98.
31. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2005. 7 (3): 271-285.
32. Сяянова Е.А., Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р. и др. Мониторинг хронической инфекции легких у больных муковисцидозом, вызванной бактериями *Pseudomonas aeruginosa*. Педиатрия 2018; 97 (2): 77–86 DOI: 10.24110/0031-403X-2018-97-2-77-86.
33. Чернуха М.Ю., Шагинян И.А., Жуховицкий В.Г. и др. Применение системы MALDI Biotyper и алгоритма микробиологической диагностики для идентификации неферментирующих микроорганизмов, выделенных из дыхательных путей у больных муковисцидозом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2017; 19 (4): 327-334.
34. Wellinghausen N, Köthe J, Wirths B et al. Superiority of molecular techniques for identification of gram-negative, oxidase-positive rods, including morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2005 Aug;43(8):4070-5. doi: 10.1128/JCM.43.8.4070-4075.2005. PMID: 16081953; PMCID: PMC1233906.
35. Erickson DL, Endersby R, Kirkham A et al. Quorum Sensing and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during Lung Infection of Cystic Fibrosis Patients. Infect Immun. 2002 Apr;70(4):1783-90. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010115
36. Driffield K, Miller K, Bostock JM et al. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. J Antimicrob Chemother. 2008 May и 61(5):1053-6. https://doi.org/10.1093/jac/dkn044.
37. Rodrigues E.R., Ferreira A.G., Leão R.S. et al. Characterization of *Achromobacter* Species in Cystic Fibrosis Patients: Comparison of blaOXA-114PCR Amplification, Multilocus Sequence Typing, and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry // J Clin Microbiol. – 2015. – Vol. 53. – N. 12. – P. 3894–3896. doi: 10.1128/JCM.02197-15.
38. Papalia M, Almuzara M, Cejas D et al. OXA-258 from *Achromobacter ruhlandii*: a species-specific marker. J Clin Microbiol. 2013 May; 51(5):1602-5. doi: 10.1128/JCM.03043-12. Epub 2013 Mar 6. PMID: 23467601; PMCID: PMC3647942.
39. Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н. и др. Разнообразие и опасность *Achromobacter* spp., поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом. Пульмонология 2015; 25(4): 389-402. https://doi.org/10.18093/0869-0189-2015-25-4-389-402.
40. https://lpsn.dsmz.de/genus/burkholderia (дата обращения: 17.05.23)
41. Kiska DL, Kerr A, Jones MC et al. Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other Gram-negative non-fermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1996; 34: 886-891. doi: 10.1128/jcm.34.4.886-891.1996. PMID: 8815102; PMCID: PMC228911.
42. Roberts G.D., Goodman N.L., Heifets L., et al. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens // J Clin Microbiol. 1983 Sep;18(3):689-96. doi: 10.1128/jcm.18.3.689-696.1983. PMID: 6195181; PMCID: PMC270876.
43. Meena DS, Kumar D. Candida Pneumonia: An Innocent Bystander or a Silent Killer? Med Princ Pract. 2022;31(1):98-102. doi: 10.1159/000520111. Epub 2021 Oct 12. PMID: 34638123; PMCID: PMC8995637.
44. Xu Y, Chen M, Zhu J et al. Aspergillus Species in Lower Respiratory Tract of Hospitalized Patients from Shanghai, China: Species Diversity and Emerging Azole

- Resistance. *Infect Drug Resist.* 2020;13:4663-4672 <https://doi.org/10.2147/IDR.S281288>
45. Thornley PE, Aitken J, Drennan CJ et al. *Branhamella catarrhalis* infection of the lower respiratory tract: reliable diagnosis by sputum examination. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982 Nov 27;285(6354):1537-8. doi: 10.1136/bmj.285.6354.1537. PMID: 6814637; PMCID: PMC1500508.
46. Wiscovitch-Russo R, Singh H et al. An optimized approach for processing of frozen lung and lavage samples for microbiome studies. *PLoS One*. 2022 Apr 5;17(4):e0265891. doi: 10.1371/journal.pone.0265891. PMID: 35381030; PMCID: PMC8982836.
47. Baum, T. Welte, R. Marre, N. Suttorp, S. Ewig for the CAPNETZ study group Community-acquired pneumonia through Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*: diagnosis, incidence and predictors. *European Respiratory Journal* 2010 35: 598-615; DOI: 10.1183/09031936.00091809
48. Musher DM, 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 Jul 15;39(2):165-9. doi: 10.1086/421497. Epub 2004 Jul 1. PMID: 15307023.
49. Ogawa H, Kitsios GD, Iwata M, Terasawa T. Sputum Gram Stain for Bacterial Pathogen Diagnosis in Community-acquired Pneumonia: A Systematic Review and Bayesian Meta-analysis of Diagnostic Accuracy and Yield. *Clin Infect Dis*. 2020 Jul 27;71(3):499-513. doi: 10.1093/cid/ciz876. PMID: 31504334; PMCID: PMC7384319.
50. Musher DM, Abers MS, Bartlett JG. Evolving Understanding of the Causes of Pneumonia in Adults, With Special Attention to the Role of Pneumococcus. *Clin Infect Dis*. 2017 Oct 30;65(10):1736-1744. doi: 10.1093/cid/cix549. PMID: 29028977; PMCID: PMC7108120.
51. Henig O, Kaye KS. Bacterial Pneumonia in Older Adults. *Infect Dis Clin North Am*. 2017 Dec;31(4):689-713. doi: 10.1016/j.idc.2017.07.015. Epub 2017 Sep 13. PMID: 28916385; PMCID: PMC7127502.
52. Verhelst R, Kaijalainen T, De Baere T et al. Comparison of five genotypic techniques for identification of optochin-resistant pneumococcus-like isolates. *J Clin Microbiol*. 2003 Aug;41(8):3521-5. doi: 10.1128/JCM.41.8.3521-3525.2003. PMID: 12904349; PMCID: PMC179870.
53. Н.В. Каражас, Т.Н. Рыбалкина, М.Н. Корниенко, М.В. Юдицкий. Пневмоцистоз – актуальная иммунодефицит-ассоциированная инфекция (эпидемиология, клиника, диагностика и лечение). Методическое пособие. М., 2009.
54. Зубков М.Н. Исследования биоматериалов при инфекциях нижних дыхательных путей. Методики клинических лабораторных исследований. Том 3. Клиническая микробиология / Под ред. В.В. Меньшикова. 2009., С. 39–44.
55. Манзенюк И.Н., Шипулин Г.А. Молекулярная диагностика инфекционных заболеваний. Методики клинических лабораторных исследований. Том 3. Клиническая микробиология. Под редакцией В.В. Меньшикова. 2009. С. 698–854.
56. Писарева М.М., Едер В.А., Бузицкая Ж.В. и др. Этиологическая структура гриппа и других ОРВИ в Санкт-Петербурге в эпидемические сезоны 2012–2016 гг. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(5), 233-239.
57. Яцышина С.Б., Мамошина М.В., Елькина М.А. и др. Распространенность возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19 у лиц без симптомов респираторной инфекции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. Том 98, № 4, 2021, 383–396.
58. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В. и др. Этиология внебольничных пневмоний в период эпидемического распространения COVID-19 и оценка риска возникновения пневмоний, связанных с оказанием медицинской помощи. «Здоровье населения и среда обитания» № 7, 2021, 67-75.
59. Logunov, D.Y., Dolzhikova, I.V., Shcheblyakov, D.V. et al. (2021). Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet*, 397(10275), 671-681. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00234-8.
60. Logunov, D.Y., Dolzhikova, I.V., Zubkova, O.V., Tikhvatulin, A.I., Shcheblyakov, D.V., Dzharullaeva, A.S., Gintsburg, A.L. (2020). Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *The Lancet*, 396(10255), 887-897. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
61. Tikhvatulin, A.I., Dolzhikova, I.V., Shcheblyakov, D.V. et al. (2021). An open, non-randomised, phase 1/2 trial on the safety, tolerability, and immunogenicity of single-dose vaccine “Sputnik Light” for prevention of coronavirus infection in healthy adults. *The Lancet Regional Health-Europe*, 11, 100241. doi: 10.1016/j.lanepe.2021.100241.
62. Sukhikh G.T., Pripitnevich T.V., Ogarkova D.A. et al. Sputnik Light and Sputnik V Vaccination Is Effective at Protecting Medical Personnel from COVID-19 during the Period of Delta Variant Dominance. *Vaccines* 2022, 10, 1804, 1-11. doi: 10.3390/vaccines10111804.
63. Gushchin V.A., Pochtovyi A.A., Kustova D.D. et al. Dynamics of SARS-CoV-2 Major Genetic Lineages in Moscow in the Context of Vaccine Prophylaxis. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 14670, 1-16 doi: 10.3390/ijms232314670.
64. Solé Violán J., Rodríguez de C.F, Caminero L.J et al. Comparative efficacy of bronchoalveolar lavage and telescoping plugged catheter in the diagnosis of pneumonia in mechanically ventilated patients. *Chest*. 1993 Feb; 103(2):386-90. doi: 10.1378/chest.103.2.386. PMID: 8432124.
65. Robinson J. Colonization and infection of the respiratory tract: What do we know? *Paediatr Child Health*.

2004 Jan; 9(1):21-4. doi: 10.1093/pch/9.1.21. PMID: 19654976; PMCID: PMC2719511.

66. Walsh TJ, Chanock SJ. Diagnosis of invasive fungal infections: advances in nonculture systems. *Curr Clin Top Infect Dis.* 1998;18:101-53. PMID: 9779353.

67. Moss BJ, Musher DM. Candida species in community-acquired pneumonia in patients with chronic aspiration. *Pneumonia (Nathan).* 2021 Jul 5;13(1):12. doi: 10.1186/s41479-021-00090-x. PMID: 34218811; PMCID: PMC8256547.

68. Mandell LA, Bartlett JG, Dowell SF et al. Update of practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. *Clin Infect Dis.* 2003 Dec 1;37(11):1405-33. doi: 10.1086/380488. Epub 2003 Nov 3. PMID: 14614663; PMCID: PMC7199894.

69. Mathers G. Bacteriology of the urine in lobar pneumonia // *J. Infect. Dis.* — 1916. — Vol. 19. 416–418.

70. Jaroszewski DE, Webb BJ, Leslie KO. Diagnosis and management of lung infections. *Thorac Surg Clin.* 2012 Aug;22(3):301-24. doi: 10.1016/j.thorsurg.2012.05.002. PMID: 22789595; PMCID: PMC7106184.

71. Meduri GU, Chastre J. The standardization of bronchoscopic techniques for ventilator-associated pneumonia. *Chest.* 1992 Nov;102(5 Suppl 1):557S-564S. doi: 10.1378/chest.102.5_supplement_1.557s. PMID: 1424930.

72. Metersky ML, Ma A, Bratzler DW, Houck PM. Predicting bacteremia in patients with community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Feb 1;169(3):342-7. doi: 10.1164/rccm.200309-1248OC. Epub 2003 Nov 20. PMID: 14630621.

73. Perfect JR, Bicanic T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal Genet Biol.* 2015 May; 78:49-54. doi: 10.1016/j.

fgb.2014.10.003. Epub 2014 Oct 13. PMID: 25312862; PMCID: PMC4395512

74. Saccente M, Woods GL. Clinical and laboratory update on blastomycosis. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Apr;23(2):367-81. doi: 10.1128/CMR.00056-09. PMID: 20375357; PMCID: PMC2863359.

75. Miyashita N, Ouchi K, Kishi F et al. Rapid and simple diagnosis of *Chlamydomyces pneumoniae* pneumonia by an immunochromatographic test for detection of immunoglobulin M antibodies. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 Jul;15(7):1128-31. doi: 10.1128/CVI.00085-08. Epub 2008 May 14. PMID: 18480232; PMCID: PMC2446634.

76. Azar MM, Hage CA. Laboratory Diagnostics for Histoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2017 Jun;55(6):1612-1620. doi: 10.1128/JCM.02430-16. Epub 2017 Mar 8. PMID: 28275076; PMCID: PMC5442517.

Информация об авторах

Чернуха Марина Юрьевна — д. м. н., зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ; тел.: (903) 536-62-37; e-mail: chernukha@gamaleya.org (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2349-8556>)

Аветисян Лусине Ремуальдовна — д. м. н., зав. лабораторией эпидемиологии оппортунистических инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ; тел.: (905) 597-77-27; e-mail: lusavr@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9053-2515>)