О. Л. Боророва, Я. О. Дзюблик, В. А. Ячник

СУЧАСНІ МЕТОДИ ЕТІОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ГОСТРИХ НЕГОСПІТАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЙ НИЖНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Е. Л. Боророва, Я. А. Дзюблик, В. А. Ячник

Резюме

В обзоре представлены возможности различных методов этиологической диагностики, применяемых в пульмонологии.

Основным методом диагностики острых внебольничных инфекций нижних дыхательных путей остается микробиологический подход, который включает в себя микроскопию материала от больного с покраской по Граму, посевы на питательные среды, выделение культуры, идентификацию и определение чувствительности микроорганизма к антибиотикам. Но, к сожалению, примерно у половины пациентов не удается выявить этиологический фактор.

В последнее время приобретают популярность молекулярные методы этиологической диагностики. Они характеризуются большей чувствительностью, чем микробиологические методы и позволяют гораздо быстрее получить результат. Тесты молекулярной диагностики делятся на четыре категории в зависимости от механизма, который положен в их основу: иммуноанализ, методы гибридизации, методы амплификации и секвенирования.

Среди тестов, основанных на принципах иммуноанализа, достойны внимания экспресс-тесты, которые наиболее соответствуют представлению об идеальном диагностическом средстве в области лабораторной медицины. Они быстрые, простые, дешевые, высокочувствительные и высокоспецифичные. Однако для появления специфических антител в организме нужно определенное время, результаты тестов на основе иммуноанализа остаются положительными в течение нескольких недель после перенесенного эпизода острой внебольничной инфекции нижних дыхательных путей, поэтому они имеют диагностическую ценность только при наличии клинических проявлений заболевания.

Генетический подход в свою очередь позволяет выявлять инфекционные возбудители в ранней фазе заболевания, когда серологические и иммунологические методы неэффективны.

Все большую распространенность в последнее время приобретают и тесты на основе амплификации нуклеиновых кислот, в том числе – ПЦР. Данные методы целесообразно использовать для диагностики атипичных возбудителей и респираторных вирусов, поскольку их выращивание в культуре представляет трудности.

Активно развиваются методы секвенирования и масс-спектрометрии, но существует ряд ограничений, которые не позволяют их использовать в повседневной клинической практике.

Таким образом, сочетание микробиологического подхода с методами молекулярной диагностики является наиболее оптимальным для идентификации возбудителя острых внебольничных инфекций нижних дыхательных путей и назначения целенаправленного этиотропного лечения.

Ключевые слова: острые внебольничные инфекции нижних дыхательных путей, этиологическая диагностика, микробиологические, серологические, иммунологические, молекулярно-генетические методы, ИХА, ПЦР, секвенирование, масс-спектрометрия.

Укр. пульмонол. журнал. 2021;29(3):58–65:

Боророва Олена Леонідівна
ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»
Відділення технологій лікування неспецифічних захворювань легень
Молодший науковий співробітник
Вул. М. Амосова, 10, 03680, м. Київ
Тел.: +380933549141, elena_bororova@ukr.net

MODERN METHODS OF ETIOLOGICAL DIAGNOSING OF ACUTE COMMUNITY-ACQUIRED LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTIONS

O. L. Bororova, Y. O. Dziublyk, V.A. Iachnyk

Abstract

The review presents the possibilities presented by various methods of etiological diagnostics used in pulmonology.

The main method of diagnosing acute community-aquired lower respiratory tract infections is the microbiological approach which includes microscopy of patient's material with Gram staining, cultures on nutrient media, isolation of culture, identification and determination of susceptibility of a microorganism to antibiotics. But unfortunately the etiologocal factor cannot be detected in about half of patients.

Recently, the popularity of molecular methods of etiological diagnosis has grown. They are characterized by greater sensitivity to microbiological methods and allow to get results faster. Molecular diagnostic tests are divided into four categories depending on the mechanism based on them: immunoassay, hybridization methods, amplification and sequencing methods.

Among the tests based on the principles of immunoassay, noteworthy are rapid tests, which are most consistent with the idea of an ideal diagnostic tool in the field of laboratory medicine. They are fast, simple, cheap, highly sensitive and highly specific. However, as the appearance of specific antibodies in the body takes some time, the results of tests based on immunoassay remain positive for several weeks after the delayed episode of acute community-acquired lower respiratory tract infection, so they have diagnostic value only in the presence of clinical manifestations of the disease.

The genetic approach allows the detection of infectious agents in the early stages of the disease, when serological and immunological methods are ineffective.

Tests based on nucleic acid amplification, including PCR, have also become increasingly common recently. These methods should be used for the diagnosis of atypical pathogens and respiratory viruses, because their cultivation in culture is difficult.

Sequencing and mass spectrometry methods are being actively developed, but there are limitations that prevent their use in everyday clinical practice.

So the combination of microbiological approach with molecular diagnostic methods is the most optimal for the identification of the causative agent of acute community-acquired lower respiratory tract infections and the use of targeted etiotropic treatment.

Key words: acute community-acquired lower respiratory tract infections, etiological diagnosis, microbiological, serological, immunological, molecular genetic methods, ICA, PCR, sequencing, mass spectrometry.

Ukr. Pulmonol. J. 2021;29(3):58–65:

Olena Bororova
SI "National Institute of Phthisiology and Pulmonology named after F. G. Yanovsky
National Academy of Medical Sciences of Ukraine"
Department of Technology for the Treatment of Non-Specific Lung Diseases
Junior research assistant
10, M. Amosova str., 03038, Kyiv, Ukraine
Tel. +380933549141, elena_bororova@ukr.net

© Боророва О. Л., Дзюблик Я. О., Ячник В. А., 2021

www.search.crossref.org
DOI: 10.31215/2306-4927-2021-29-3-58-65

Термін гострі негоспітальні інфекції нижніх дихальних шляхів (ГНІНДШ) об'єднує в собі такі нозології, як негоспітальна пневмонія, гострий бронхіт, грип, загострення хронічного обструктивного бронхіту та бронхоектатичної хвороби. Не дивлячись на те, що дані патологічні стани давно відомі людству, вони досі залишаються актуальною проблемою пульмонології, враховуючи значну поширеність та тенденцію до зростання захворюваності. Відомо, що ГНІНДШ посідають лідируючі позиції в загальній структурі смертності, щорічні економічні збитки від даних хвороб оцінюються в більйони євро.

Покращити результати лікування пацієнтів з ГНІНДШ, скоротити терміни перебування пацієнтів у стаціонарі та знизити вартість медикаментозної терапії можна шляхом своєчасного призначення цілеспрямованої етіотропної терапії. Здійснити такий крок дозволяє лише швидка і точна ідентифікація збудника ГНІНДШ. У разі неможливості виявити етіологічний чинник ГНІНДШ до початку лікування зазвичай призначається емпірична антибіотикотерапія. У такому випадку вибір препаратів базується на регіональних даних щодо поширеності бактеріальних збудників та їх резистентності до антимікробних препаратів [1]. Для адекватного формування рекомендацій з емпіричного лікування у різних категорій пацієнтів та своєчасної корекції терапії теж необхідний регулярний моніторинг структури збудників та їх чутливості до антимікробних препаратів [2].

Етіологічна діагностика також має важливе епідеміологічне значення з точки зору профілактики епідемій (SARS, COVID-19, вірус грипу, Legionella spp.) і виявлення фактів біотероризму (збудники чуми, туляремії, сибірської виразки) [2]. Характеристика і докладний аналіз респіраторних вірусів особливо важливі для спостереження за здоров'ям населення (для моніторингу антигенного дрейфу, вибору та оцінки ефективності противірусних вакцин і появи нових штамів вірусів) [3].

Існує широкий вибір методів етіологічної діагностики, які можуть бути спрямовані на виявлення самого збудника інфекційного захворювання (прямі методи) та діагностичних маркерів інфікування цим збудником (непрямі методи). Пріоритетом в етіологічній діагностиці інфекційних захворювань людини є прямі методи. Саме до них відносяться: мікроскопія (зокрема електронна мікроскопія), бактеріологічне дослідження з виділенням збудника, вірусологічне дослідження, методи ампліфікації нуклеїнових кислот, включаючи полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) тощо. Прямі методи формують підґрунтя для встановлення остаточного діагнозу інфекційного захворювання. Діагностичними маркерами переважно виступають специфічні антигени збудника (АГ), фрагменти геномних РНК та ДНК, специфічні антитіла (АТ), що утворюються у відповідь на інфікування організму людини тим чи іншим збудником захворювання [4, 5].

Не дивлячись на сучасні наукові досягнення та відкриття, на жаль, ще не розроблений «золотий стандарт» етіологічної діагностики ГНІНДШ. У багатьох випадках етіологічна діагностика цих патологій утруднена. Перепонами можуть бути особливості, які потрібно враховувати під час оцінювання результатів обстеження [2]:

– збудниками можуть бути мікроорганізми з різними біологічними властивостями (віруси, бактерії, гриби, найпростіші), що визначає широкий перелік методів дослідження;

– матеріал, який використовується для мікробіологічної діагностики (респіраторні зразки), найчастіше контаміновані мікрофлорою верхніх дихальних шляхів і порожнини рота, що ускладнює інтерпретацію отриманих даних;

– мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* і *S. aureus*, будучи нечастими збудниками ГНІНДШ, можуть контамінувати мокроту;

– може мати місце ко-інфекція.

Важливу роль також відіграють такі фактори, як якість взяття матеріалу, його збереження і транспортування, кваліфікація працівників лабораторії, наявність відповідних поживних середовищ та реактивів, тощо [6].

Тому є актуальним пошук нових підходів діагностики та вдосконалення існуючих.

На сьогодні основою діагностики бактеріальних, вірусних та грибкових інфекцій залишається мікробіологічний метод [7]. Вагомою перевагою культуральних досліджень є те, що під час їх проведення виявляється лише живий збудник інфекції. Зазначений метод дозволяє оцінити фенотипову резистентність до широкого спектру антимікробних препаратів. З цією метою в мікробіологічних лабораторіях застосовуються диско-дифузійний метод та його модифікації (метод комбінованих дисків (рис. 1), метод подвійних дисків (рис. 2)), а також Е-тести (рис. 3) та методи серійних розведень (у рідкому поживному середовищі (рис. 4) або на агарі).

Диско-дифузійний метод одним з перших був винайдений і впроваджений в практику. На сьогодні це найпоширеніший спосіб. Він є найбільш універсальним і не

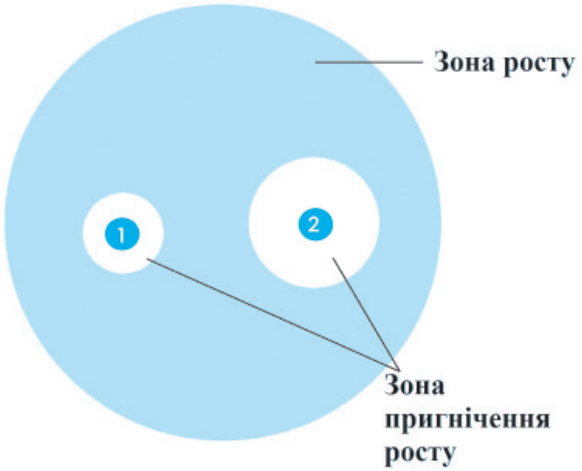

Рис 1. Визначення антибіотикорезистентності методом комбінованих дисків: 1 — диск, що містить один цефалоспорин (цефотаксим, цефтазидим, цефепім); 2 — диск, що містить один цефалоспорин (цефотаксим, цефтазидим, цефепім) в комбінації з інгібітором бета-лактамаз (клавулановою кислотою). Зону інгібування навколо диска або таблетки цефалоспорину у поєднанні з клавулановою кислотою порівнюють із зоною навколо диска або таблетки з одним цефалоспорином. Випробування позитивне, якщо діаметр зони інгібування другого диска ≥ 5 мм, ніж першого диска.

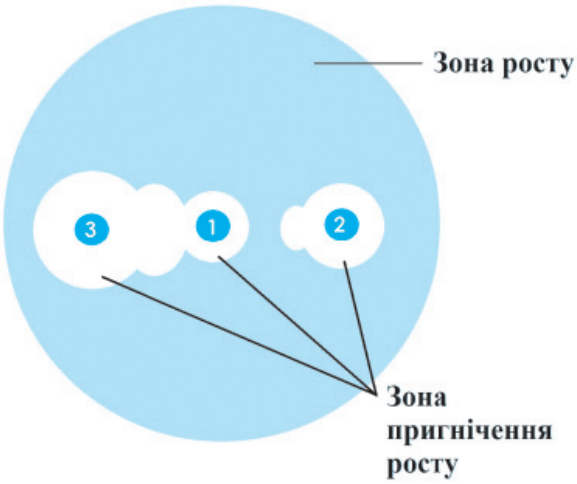

Рис 2. Визначення антибіотикорезистентності методом парних дисків: 1 – диск, що містить один інгібітор бета-лактамаз (клавуланову кислоту); 2, 3 – диски, що містять різні цефалоспорини. Позитивним результат вважається, коли зони інгібування навколо будь-якого з дисків із цефалоспорином збільшуються у напрямку диску, що містить клавуланову кислоту.

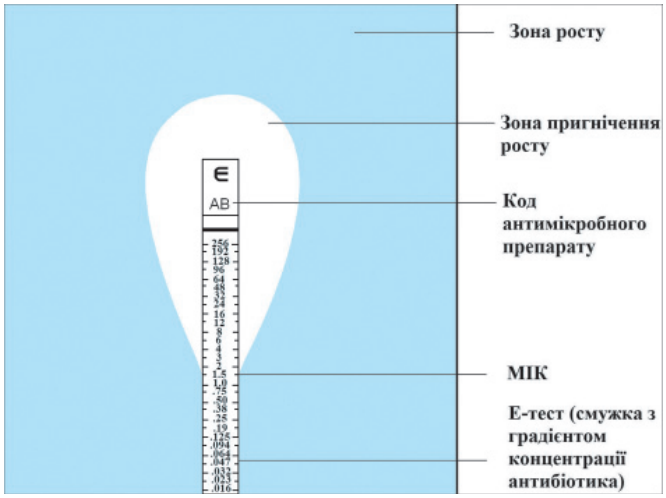

Рис. 3. Е-тест – градієнтні випробування проводяться, тлумачаться та інтерпретуються відповідно до інструкцій виробника.

Рис. 4. Методика серійних розведень. МІК – мінімальна інгібуюча концентрація.

потребує додаткового обладнання. Іншим дифузійним методом виявлення антибіотикорезистентності (АБР) є метод із використанням Е-тестів. Відмінність від попереднього способу полягає в тому, що замість дисків з антибіотиком, використовують смужки, які містять градієнт концентрації антибіотика від максимальної до мінімальної. Це дає змогу визначити мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК), що є «золотим» стандартом оцінки антибіотикорезистентності (ВООЗ) [8]. Обидва методи прості у використанні, і доступні для лабораторій будь-якого рівня. Але з економічних міркувань у рутинній роботі перевага надається диско-дифузійному методу. З метою оцінювання МІК антибактеріальних препаратів у лабораторній практиці також використовується методи серійних розведень. Вони характеризується високою точністю та інформативністю, але пов'язані зі значними методичними труднощами: необхідність використання субстанцій антибіотиків з відомим рівнем активності, суворого дотримання режимів зберігання, ретельного виконання контролю якості поживних середовищ, трудомісткості приготування робочих розчинів антибіотиків [9]. На противагу цим дослідженням, автоматичний метод потребує проведення менше маніпуляцій, швидше видає результат, є стандартизованим. Проте його використання обмежене через високу вартість та необхідність постійного технічного обслуговування обладнання, а також недостатню візуалізацію синергії та антагонізмів [9].

Відомо, що мікробіологічна діагностика має низку обмежень. Основними недоліками культуральної діагностики є те, що приблизно в половині випадків ГНІНДШ не вдається виявити етіологічний чинник, крім того не можна виключити імовірність отримання хибнонегативного результату на тлі прийому антимікробних препаратів [6, 10]. Робота з вірусними культурами зі свого боку характеризується високим рівнем біонебезпеки [11]. Тому вірусологічні дослідження (зараження культур клітин або курячих ембріонів з метою ізоляції та ідентифікації вірусу), а також роботи, пов'язані з утворенням аерозолю вірусів з пандемічним потенціалом, виконуються лише в умовах лабораторії з третім або четвертим рівнем біобезпеки (BSL-3 або BSL-4) [12]. У разі виявлення антибіотикорезистентності, для культурального методу характерні суб'єктивність оцінювання результату та низький рівень стандартизації, також цей метод не дає інформацію про генетичні механізми, що лежать в основі антибіотикорезистентності мікроорганізмів. Крім того мікробіологічний метод вимагає значної затрати часу для його проведення, оскільки стандартна культуральна діагностика триває від 3–4 діб до кількох тижнів [7, 8]. Новітні розробки (хромогенні поживні середовища та набори реагентів, набори дисків для прискореної ідентифікації АБР) дозволяють скоротити час проведення дослідження до 24 год, однак це також не дає змоги застосовувати мікробіологічну діагностику на долікарняному етапі дообстеження хворого.

Останнім часом набувають популярності молекулярні методи етіологічної діагностики. Вони характеризуються більшою чутливістю порівняно з мікробіологічними методами та, головне, дозволяють набагато швид-

ше отримати результат [8]. Згідно з ВООЗ, тести молекулярної діагностики поділяються на чотири категорії залежно від механізму, що покладений в їх основу: імуноаналіз, методи гібридизації, методи ампліфікації та секвенування [8]. Принцип імуноаналізу базується на реакціях зв'язування антитіл з цільовими антигенами; гібридизації – гібридизований зонд (нуклеїнова кислота) з'єднується з комплементарною генною послідовністю; в основі реакцій ампліфікації лежить збільшення кількості копій цільового гену, що дозволяє його ідентифікацію; метод секвенування дає змогу проводити аналіз цілого геному [8].

Варті уваги такі імунологічні методи діагностики, як ІФА, РІА, ІБ, пряма й непряма імунофлуоресценція та ін. Перевагами цих тестів є швидкість (менше 4 год) та простота проведення, низька вартість досліджень, високі чутливість та специфічність, можливість визначення кількох маркерів резистентності одночасно, можливість стандартизації та автоматизації [6, 8]. До недоліків відноситься те, що виявити можна лише відомі збудники та їх генні мутації, недостатньо доказів економічної ефективності використання імунологічних тестів у клінічній практиці, збереження позитивного результату аналізу після вилікування, потреба у використанні спеціального обладнання [6, 8, 11].

Одним із опосередкованих способів визначення етіології інфекційного процесу є серологічний метод, заснований на визначенні специфічних антитіл у парних сироватках. Ці тести зазвичай проводяться з метою виявлення атипових збудників і включають оцінку рівня антитіл у парних сироватках (з інтервалом в декілька тижнів) [13]. Тому серологічний метод діагностики не допомагає в початковій оцінці етіологічного фактора ГНІНДШ і зазвичай не рекомендується для рутинного використання, але може мати велике значення для ретроспективного аналізу та епідеміологічних досліджень [13].

На використанні імунологічних реакцій базуються і прості швидкі тести (ШТ). Практичне впровадження перших ШТ показало, що вони відповідають сучасній уяві про ідеальний діагностичний засіб в галузі лабораторної медицини. Чутливість і специфічність цих тестів досягає 80-100%. Вони дешеві і прості у використанні (рис. 5, 6), не мають необхідності спеціальних умов зберігання, мають внутрішній контроль. Оцінювати результат під час проведення ШТ можна вже через 5–30 хв. [4]. Ще однією перевагою експрес-тестів є те, що прийом антимікробних препаратів не впливає на результат [14].

У різних країнах світу ШТ успішно застосовуються в інфектології та багатьох інших напрямках медицини як для поодиноких досліджень, так і у великому їх потоці. Впровадження ШТ підтримують ВООЗ і Глобальний фонд, вони рекомендуються для застосування в міжнародних програмах з контролю за хворобами, що передаються статевим шляхом, у програмах, пов'язаних із ВІЛ-інфекцією тощо [4]. В пульмонологічній практиці використовують ШТ на основі імунохроматографічного аналізу (ІХА) для виявлення вірусу грипу А та В, коронавірусу, респіраторно-синцитіального та аденовірусу, а також діагностикуми для виявлення антигенів пневмокока і легіонели в сечі [11]. Але під час проведення швидких тестів потрібно пам'ятати, що вони залишаються позитивними протягом декількох тижнів після перенесеного епізоду негоспітальної пневмонії, тому мають діагностичну цінність тільки за наявності клінічних проявів захворювання [2, 15].

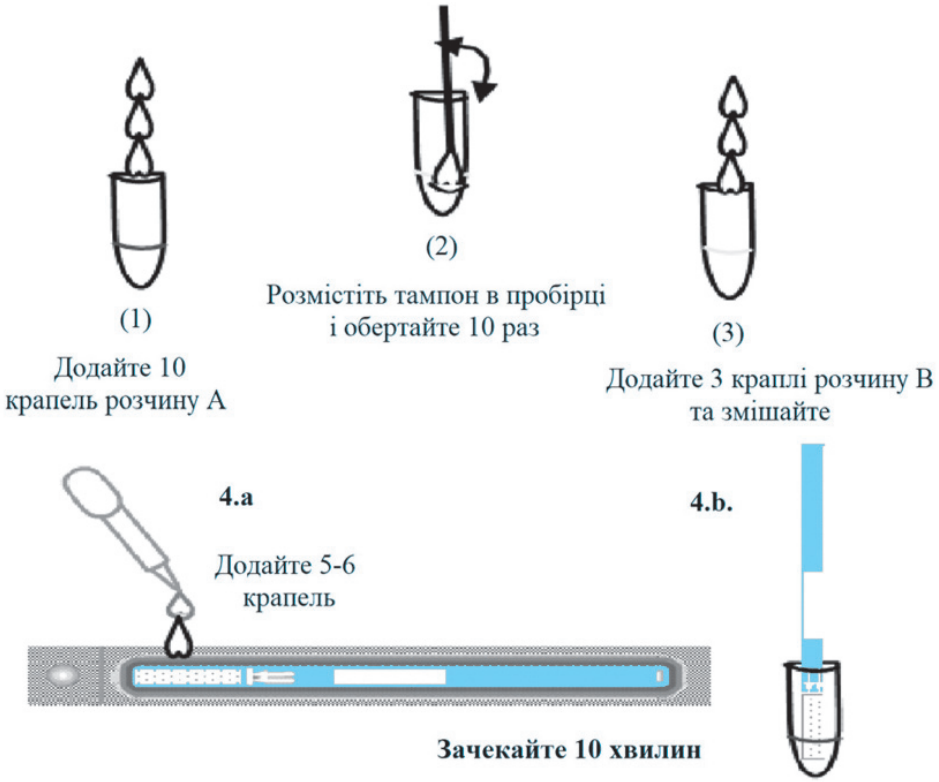

Рис. 5. Порядок дослідження на грип А+В під час застосування «швидкого» тесту (матеріал – мазок зі слизової оболонки носової порожнини).

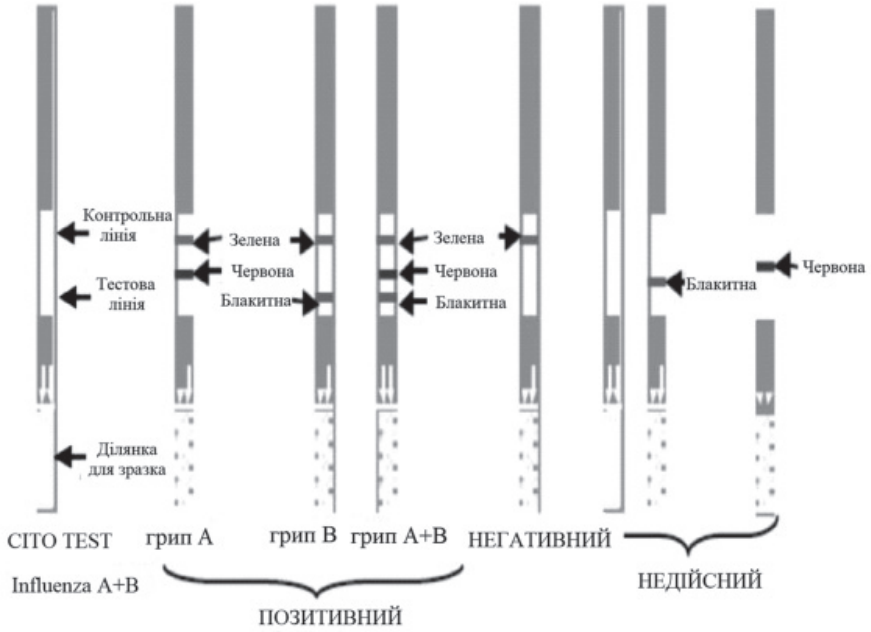

Рис. 6. Інтерпретація результату дослідження на грип A+B під час застосування «швидкого» тесту.

Натомість генетичний підхід дозволяє виявляти саме збудники інфекцій, зокрема, на ранній фазі захворювання, коли серологічні та імунологічні методи неефективні [11, 16].

Натепер тести ампліфікації нуклеїнових кислот (NAAT – nucleid acid amplification test) – єдиний доступний метод для більшості нових респіраторних вірусів, оскільки вони або не ростуть, або ростуть погано в культурі клітин, і для яких не було комерціалізовано ефективних методів виявлення антигенів [5]. Методи ампліфікації нуклеїнових кислот повністю автоматизовані, реагенти можна зберігати за кімнатної температури, іноді апарати оснащені змінними батареями (забезпечує мобільність) [12]. Недоліками NAAT є: збільшення вартості реагентів, більший час роботи, ніж для швидких тестів, необхідність знати принаймні частину цільового геному для створення відповідних праймерів і зондів [5, 8]. До того ж велика кількість респіраторних вірусів є РНК-вірусами, які більше схильні до генетичних мутацій, що може впливати на чутливість та надійність молекулярного методу [5].

Однією з NAAT є полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР), яка характеризується швидкістю, високою чутливістю та специфічністю (95–100 %) [11, 17]. В основі методу лежить проведення декількох циклів ампліфікації цільового фрагмента ДНК за допомогою праймерів та термофільної ДНК-полімерази з подвоєнням кількості фрагментів у кожному циклі ампліфікації. Результати реакції можуть оцінюватися в кінці реакції або – в реальному часі [16]. За допомогою ПЛР-діагностики можливе виявлення геному збудника, починаючи з 3–6 діб від моменту інфікування, а також в період так званого «серологічного вікна». Застосування методу ПЛР є пріоритетним в той період, коли сероконверсія ще не відбулась. Перевагами методу є не тільки високі показники чутливості та специфічності, але й відтворюваність, експресність виконання, широкий спектр і малий об'єм досліджуваного матеріалу, автоматизація етапів проведення ПЛР та обліку результатів з можливістю їх відеодокументування [18]. Обмеження методу ПЛР полягають в тому, що, по-перше, ампліфікується ДНК як живих, так і неживих мікроорганізмів. Це обумовлює вимоги до інтерпретації і термінів проведення досліджень під час контролю ефективності лікування. По-друге, теоретично існує можливість перехресних реакцій (наприклад, у результаті неадекватного підбору праймерів), що може призвести до появи хибнопозитивних результатів [19].

До модифікацій полімеразної ланцюгової реакції належать ПЛР із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР), мультиплексна ПЛР, а також ПЛР у реальному часі. ЗТ-ПЛР дає змогу виявляти РНК вірусів. Це швидкий метод аналізу (достатньо 1–2 год), хоча чутливість для різних штамів може відрізнятися і лімітована стадією зворотної транскрипції [16]. Мультиплексна ПЛР дозволяє протягом години виявляти генетичний матеріал більш ніж 20 збудників одночасно (атипові бактерії, грам-позитивні та грам-негативні бактерії, віруси та маркери резистентності), що є економічно вигідно у порівнянні з моноплексною ПЛР [5, 16]. ПЛР у режимі реального часу — це один із сучасних варіантів методу, що застосовується для кількісного визначення вірусних нуклеїнових кислот в досліджуваному зразку. В основі цього варіанту дослідження лежить кількісна детекція флюоресцентного сигналу, який збільшується пропорційно кількості ПЛР продукту. Результат реакції можна реєструвати на екрані монітора комп'ютера безпосередньо в процесі ПЛР-ампліфікації [16, 19]. Переваги ПЛР у реальному часі наступні [6]:

інформацію щодо складу проби й плину реакції можна отримувати, не відкриваючи пробірку, що прискорює отримання результату, знижує небезпеку контамінації.

– наявність специфічного зонду, який є комплементарним внутрішній ділянці фрагменту та додатково

перевіряє специфічність отриманого фрагменту, знижує ризик отримання псевдопозитивних результатів.

– реєстрація інтенсивності флюоресценції дозволяє визначити кількість інфекційного агенту в пробі вихідного матеріалу.

Розроблено протоколи ідентифікації *M. pneumoniae, C. pneumoniae, L. pneumophila, B. pertussis* та цілої низки респіраторних вірусів [6, 20, 21]. Використання ПЛР для діагностики позагоспітальної пневмонії, зумовленої атиповими збудниками, є доцільним через складність і тривалість їх виділення у культурі [6, 20]. На відміну від імунологічних тестів, ПЛР не дає хибнонегативних результатів на ранніх стадіях захворювання. Чутливість та специфічність методу для виділення атипових збудників становить 97.4 % та 98.6 % відповідно [21]. На сьогодні ПЛР в реальному часі – найбільш чутливий і специфічний метод тестування на грип з отриманням результатів впродовж 4–6 год після подачі зразка. ЗТ-ПЛР показує більш високу чутливість, ніж вірусні культури, може бути використана як підтверджувальний тест, і корисна для швидкого визначення типів і підтипів грипу [3, 21].

Мультиплексна ПЛР у реальному часі демонструє високу чутливість і під час визначення *S. pneumoniae* та *H. influenzae* у бронхо-альвеолярних змивах хворих на пневмонію [6]. Проблема з інтерпретацією результатів на фоні стрептококового носійства може частково бути вирішена шляхом кількісного визначення числа копій ДНК у препараті (кількісна ПЛР у реальному часі) [6].

Але не дивлячись на всі переваги методу, місце ПЛР в етіологічній діагностиці НІНДШ остаточно не визначено, оскільки доступні тест-системи потребують валідації, а отримані результати не завжди однозначно узгоджуються з клінічним перебігом захворювання [6].

Відносно новим методом діагностики із використанням техніки ампліфікації нуклеїнових кислот є метод ізотермальної петльової ампліфікації (LAMP – Loop-mediated isothermal amplification), винайдений у 2000 р. Особливість методу полягає в тому, що він не потребує циклічних змін температурного режиму. Це дає LAMP низку переваг порівняно з ПЛР — спрощення процедури проведення, зменшення часу реакції (від 10 хв), а також відсутність потреби у вартісному ампліфікаторі (можна використовувати термостат або водяну баню) [22]. Як і ПЛР, LAMP має такі модифікації, як LAMP зі зворотною транскрипцією, мультиплексна LAMP, LAMP у реальному часі.

Розроблені протоколи ідентифікації багатьох респіраторних патогенів за допомогою LAMP: бактеріальних збудників (*Mycobacterium tuberculosis, S.pneumoniae, H. influenzae, S. aureus*, *Bordetella pertussis*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa, M. pneumonia, L. pneumophilla), вірусів (аденовірус, цитомегаловірус, вірус грипу, цитомегаловірус, SARS-CoV, MERS-CoV), Candida albicans* та *Pneumocystis jirovecii*, а також маркери резистентності[23].

Разом з тим, LAMP поступається ПЛР в тому, що кінцевий продукт реакції представляє собою великий не універсальний фрагмент ДНК. На основі LAMP не можуть базуватись інші методи діагностики. Також непросто підібрати праймери для забезпечення високого рівня специфічності та чутливості тесту. Вважається, що натепер мультиплексна LAMP менш ефективна за ПЛР [23].

Неампліфікаційні методи з використанням зондів базуються на реакціях гібридизації [16]. До них відносять реакцію флуоресцентної гібридизації in situ (FISH – fluorescent in situ hybridization), тести молекулярної гібридизації з типоспецифічними зондами (LPAs) та метод з використанням мікрочипів [8]. До переваг вказаних методів, окрім високої чутливості та специфічності, належать швидкість виконання та можливість виявляти кілька генів одночасно [8, 16]. Проте ці методики вимагають присутності не менше 10^6 молекул збудника в досліджуваному зразку [16]. Проблематичним є те, що для зчитування результату потрібне дороговартісне обладнання (лазер, флуоресцентний лазерний мікроскоп тощо), а іноді може виникнути і необхідність статистичної обробки результатів (під час аналізу кількох генів) [8]. ВООЗ рекомендує LPAs лише для діагностики туберкульозу. Цей метод дозволяє виявити стійкість *M. tuberculosis* до ізоніазиду, рифампіцину, фторхінолонів та ін'єкційних препаратів.

Ще одним новітнім генетичним методом діагностики є секвенування, що дає змогу отримувати величезний об'єм даних у процесі одного експерименту і дозволяє виявляти чужорідні нуклеїнові кислоти в крові без необхідності використання трудомісткого і далеко не завжди успішного культивування [8, 16]. Основними напрямками даних досліджень в мікробіології є: пошук нових патогенів, аналіз варіабельності в певних групах вірусів, визначення всієї сукупності вірусів (вірому) в організмі, вивчення процесів взаємодії в системі паразит-господар і молекулярних основ патогенезу. Особливу цінність нові технології секвенування представляють для діагностики інфекційних вірусних захворювань, так як порівняно з традиційними методами дають змогу скоротити час виявлення патогена і одночасно дають інформацію про первинну структуру його генома. На підставі аналізу цієї структури можливо передбачити стійкіст ь нового штаму до вживаних лікарських препаратів і провести оцінювання результативності наявних серологічних тестів [16].

Як і будь-яка нова технологія на етапі свого становлення, методи секвенування потребують подальшого вдосконалення [16]. Однією з найважливіших проблем є забруднення зразків нецільовими нуклеїновими кислотами. Перш за все це відноситься до ДНК господаря, що потрапляє в кров у результаті розпаду лейкоцитів або їх перманентної присутності в плазмі крові (так звана циркулююча позаклітинна ДНК). Послідовності ДНК господаря легко можуть бути розпізнані і видалені у разі біоінформативної обробки даних, отриманих під час секвенування, однак у разі малих кількостей патогенів в крові присутність ДНК господаря може істотно знизити обсяг даних щодо нуклеїнових кислот інфекційного агента [16]. Обмеженнями у використанні цього методу є дороговартісне обладнання, що потребує регулярного обслуговування кваліфікованим персоналом; інтерпретація даних та контроль якості вимагають обширної підготовки з біоінформатики; великий об'єм отриманих даних буває нелегко обробити; для його аналізу потрібен

доступ до Інтернету; недешеві витрати на зберігання даних [8].

Великі перспективи для ідентифікації патогенів, виділених в чистій культурі, мають спектральні методи вивчення цілих мікроорганізмів і їх основних компонентів [7, 24]. Розроблена проста і точна технологія мас-спектрометричної ідентифікації будь-яких видів мікроорганізмів (MALDI-TOF MS), яка дозволяє отримати результат протягом кількох хвилин [7]. Мас-спектрометрія є фізико-хімічним методом діагностики, що полягає в перетворенні досліджуваного зразка в іонізовану форму з подальшим вимірюванням кількості утворених за такої умови позитивних або негативних іонів [7, 24]. Метод повністю автоматизований і дає змогу проводити прямий мас-спектрометричний аналіз білкової фракції мікробної клітини (пряме білкове профілювання), без фракціонування та очищення окремих білків. Ідентифікація мікроорганізму здійснюється за його унікальним молекулярним складом, порівнюючи отриманий результат з існуючими базами даних [7, 24]. Особливостями і перевагами цього підходу є висока чутливість, швидкість аналізу, а також низька вартість використовуваних реактивів і матеріалів, скорочення часу ідентифікації після виявлення росту будь-якого мікроорганізму на будь-якому середовищі від 1–2 діб під час традиційних методів, до декількох хвилин для окремої проби («від колонії до видової ідентифікації») і до 1,5 години для одночасного аналізу 96 проб на панелі [7, 24]. Для дослідження потрібна одинична колонія або центрифугат рідкої культури. Для аналізу досить 10000 клітин [7]. В перспективі планується використання мас-спектрометрії не лише для ідентифікації збудника інфекції, але й для визначення його резистентності. Оскільки деякі фактори резистентності в своїй основі мають білкову природу (наприклад, β-лактамази), вони можуть бути визначені MALDI-TOF MS [24]. Складність полягає в тому, що хоча β-лактамази і високоактивні ферменти, проте експресуються в низьких концентраціях; крім того, їх молекулярна вага подібна до інших бактеріальних білків; також існують сотні типів схожих β-лактамаз [24]. Іншою стратегією виявлення антимікробної стійкості є короткотривале (до 3 год) вирощування мікроорганізму на середовищі у присутності АБП та амінокислот, мічених ізотопом. За наявності резистентності мікроорганізм буде рости, захоплюючи мічені амінокислоти та нарощуючи білкову масу [24], що може бути визначено під час мас-спектрометрії.

Висновок

Аналізуючи сучасні дані, можна дійти висновку, що у повсякденній клінічній практиці основним залишається мікробіологічний підхід із виділенням культур мікроорганізмів, оскільки лише він дозволяє не тільки встановити етіологію інфекції, але й визначити їх профіль резистентності. До того ж культуральний метод діагностики незамінний під час оцінювання життєздатності респіраторних вірусів. Разом з тим, культуральне дослідження атипових бактерій та ряду нових вірусів досить тривале та ускладнене. Встановлено, що молекулярно-біологічні методи характеризуються більшою чутливістю та специфічністю порівняно з мікробіологічними методами діагностики. Також беззаперечною перевагою молекулярно-біологічних тестів є швидкість проведення аналізу, що вкрай важливо під час призначення цілеспрямованої антимікробної терапії у разі ГНІНДШ, особливо у випадках НП, коли результат лікування залежить від термінів призначення та вибору АБП.

Ми вважаємо, що для оптимізації ідентифікації збудника гострих негоспітальних інфекцій нижніх дихальних шляхів доцільним сьогодні може бути поєднання мікробіологічного підходу з методами молекулярної діагности.

ЛІТЕРАТУРА

1. Perumal R. Community acquired pneumonia: the need to broaden our diagnostic armamentarium. African Journal of Thoracic and Critical Care Medicine. 2020;26(1):2–3. Available at: http://www.ajtccm.org.za/index.php/sarj/article/view /269
2. Рачина СА, Иваничак НВ, Козлов РС. Особенности микробиологической диагностики при внебольничной пневмонии у взрослых. Практическая пульмонология. 2016;4:40–47. Режим доступу: https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-mikrobiologicheskoy-diagnostiki-pri-vnebolnichnoy-pnevmonii-u-vzroslyh/viewer
3. Клінічна настанова, заснована на доказах «Грип та гострі респіраторні інфекції». Київ. Національна академія медичних наук України. 2018;141 с. Режим доступу: https://dec.gov.ua/wp-content/uploads/2019/11/2018_kn_gryp.pdf
4. Дзюблик ІВ, Обертинська ОВ, та ін. Швидкі ІХА–тести для етіологічної діагностики інфекційних захворювань людини. Методичні рекомендації. Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика. Київ. 2013;94 с. Режим доступу: http://pharmasco.com/upload/file/Metod_Dzublik.pdf
5. Pérez-Ruiz M et al. Laboratory Detection of Respiratory Viruses by Automated Techniques. The Open Virology Journal. 2012;6:151–159. Available at: https://benthamopen.com/FULLTEXT/TOVJ-6-151
6. Дзюблик ЯО. Негоспітальні інфекції нижніх дихальних шляхів: монографія. Вінниця : ТОВ «Меркьюрі-Поділля». 2016;255 с.
7. Холодок ГН, Морозова НВ. Современные методы и возможности этиологической верификации бронхолегочных заболеваний у детей. Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2016;60:125–130. Режим доступу: https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennye-metody-i-vozmozhnosti-etiologicheskoy-verifikatsii-bronholegochnyh-zabolevaniy-u-detey/viewer
8. Molecular methods for antimicrobial resistance (AMR) diagnostics to enhance the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System. World Health Organization. Geneva. 2019; 64 p. Available at: https://www.who.int/glass/resources/publications/molecular-methods-for-amr-diagnostics/en/
9. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: методичні вказівки. Наказ МОЗ України від 05.04.2007 р. № 167. Київ. 2007. Режим доступу: http://mozdocs.kiev.ua/view.php?id=6958

REFERENCES

1. Perumal R. Community acquired pneumonia: the need to broaden our diagnostic armamentarium. African Journal of Thoracic and Critical Care Medicine. 2020;26(1):2–3. Available at: http://www.ajtccm.org.za/index.php/sarj/article/view /269
2. Rachina SA, Ivanichak NV, Kozlov RS. Osobennosti mikrobiologicheskoy diagnostiki pri vnebolnichnoy pnevmonii u vzroslykh (Features of microbiological diagnosis in community-acquired pneumonia in adults). Prakticheskaya pulmonologiya. 2016;4:40–47. Available at: https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-mikrobiologicheskoy-diagnostiki-pri-vnebolnichnoy-pnevmonii-u-vzroslyh/viewer
3. Klinichna nastanova, zasnovana na dokazakh «Gryp ta gostri respiratorni infektsiyi» (Evidence-based clinical guidelines for Influenza and Acute Respiratory Infections). Kyyiv. Natsionalna akademiya medychnykh nauk Ukrayiny. 2018;141 s. Available at: https://dec.gov.ua/wp-content/uploads/2019/11/2018_kn_gryp.pdf
4. Dzyublyk IV, Obertynska OV, ta in. Shvydki IKHA–testy dlya etiologichnoyi diagnostyky infektsiynykh zakhvoryuvan lyudyny (Rapid IHA tests for etiological diagnosis of human infectious diseases). Metodychni rekomendatsiyi. Natsionalna medychna akademiya pislyadyplomnoyi osvity im. P.L. Shupyka. Kyyiv. 2013;94 s. Available at: http://pharmasco.com/upload/file/Metod_Dzublik.pdf
5. Pérez-Ruiz M et al. Laboratory Detection of Respiratory Viruses by Automated Techniques. The Open Virology Journal. 2012;6:151–159. Available at: https://benthamopen.com/FULLTEXT/TOVJ-6-151
6. Dzyublyk YaO. Negospitalni infektsiyi nyzhnikh dykhalnykh shlyakhiv: monohrafiya (Nosocomial infections of the lower respiratory tract: a monograph). Vinnytsya : TOV «Merkyuri-Podillya». 2016;255 p.
7. Kholodok HN, Morozova NV. Sovremennye metody i vozmozhnosty etyologicheskoy verifikatsii bronkholegochnykh zabolevaniy u detey. Byulleten fiziologii i patolohii dykhaniya (Modern methods and possibilities of etiological verification of bronchopulmonary diseases in children. Bulletin of physiology and pathology of respiration). 2016;60:125–130. Available at: https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennye-metody-i-vozmozhnosti-etiologicheskoy-verifikatsii-bronholegochnyh-zabolevaniy-u-detey/viewer
8. Molecular methods for antimicrobial resistance (AMR) diagnostics to enhance the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System. World Health Organization. Geneva. 2019; 64 p.

10. Prina E, et al. Community-acquired pneumonia. The Lancet. 2015;386(9998):1097–1108. Available at: https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(15)60733-4/fulltext
11. Charlton CL, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Viruses Causing Acute Respiratory Tract Infections. Clinical Microbiology Reviews. 2019;32(1). Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6302358/
12. Mourya DT, et al. Establishment of Biosafety Level-3 (BSL-3) laboratory: Important criteria to consider while designing, constructing, commissioning & operating the facility in Indian setting. 2014;140(2):171–183. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4216491/
13. Більченко ОС. Етіологія і фактори ризику позалікарняної пневмонії. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. 2016;27:99–105.
14. Перцева ТО, Кіреєва ТВ, Бєлослудцева КО. Маски тяжких пневмоній: алгоритми діагностики та лікування: практичний посібник. Дніпропетровськ: «Герда». 2014;64 с. Режим доступу: http://repo.dma.dp.ua/338/1/Перцева_маски тяжких пневмоній.pdf
15. Couturier MR, Graf EH, Griffin AT. Urine Antigen Tests for the Diagnosis of Respiratory Infections Legionellosis, Histoplasmosis, Pneumococcal Pneumonia. Clin Lab Med. 2014;34:219–236. Available at: https://www.labmed.theclinics.com/article/S0272-2712(14)00016-X/pdf
16. Абдурашитов МА, Нетесова НА. Определение вирусных нуклеиновых кислот в крови человека. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018;18(4)208–215. Режим доступу: https://cyberleninka.ru/article/n/opredelenie-virusnyh-nukleinovyh-kislot-v-krovi-cheloveka/viewer
17. Шемедюк НП. Характеристика можливостей імуноферментного аналізу. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Ґжицького. 2016;18 (66):212–216.
18. Дзюблик ІВ, Соловйов СО, Ковалюк ОВ. Етіологічна діагностика гострих вірусних інфекцій: роль у сучасній системі охорони здоров'я та економічна ефективність. Інфекційні хвороби. 2018;1(91):46–53.
19. Калачнюк МС, та ін. Умови проведення полімеразної ланцюгової реакції у лабораторній практиці (методичні аспекти). Біологія тварин. 2012;14(№1–2):660–667.
20. Перцева ТА. Легионеллезная пневмония: проблемы клинической практики на сегодня. Актуальні питання медичної науки та практики. 2016;1(83):118–130. Режим доступу: http://repo.dma.dp.ua/744/1/img168%20%281%29.pdf
21. Lee MS, et al. Guideline for Antibiotic Use in Adults with Community-acquired Pneumonia. Infect Chemother. 2018;50(2):160–198. Available at: https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3947/ic.2018.50.2.160
22. Макарова ЮА., и др. Изотермическая петлевая амплификация: эффективный метод экспресс-диагностики в онкологии. Онкоурология. 2018;14:88–99. Режим доступу:https://labvita.com.ua/interesting/articles/izotermichna-petliova-amplifikaciya/
23. Wong YP, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. J Appl Microbiol. 2018;124(3):626–643. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7167136/
24. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. Clinical Chemistry. 2015;61(1):100–111. Available at: https://academic.oup.com/clinchem/article/61/1/100/5611480

Available at: https://www.who.int/glass/resources/publications/molecular-methods-for-amr-diagnostics/en/
9. Vyznachennya chutlyvosti mikroorganizmiv do antybakterialnykh preparativ: metodychni vkazivky. Nakaz MOZ Ukrayiny vid 05.04.2007 r. № 167. Kyyiv. 2007 (Determination of sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs: guidelines. Decree of the Ministry of Health of Ukraine dated April 5, 2007 № 167. Kyiv. 2007). Available at: http://mozdocs.kiev.ua/view.php?id=6958
10. Prina E, et al. Community-acquired pneumonia. The Lancet. 2015;386(9998):1097–1108. Available at: https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(15)60733-4/fulltext
11. Charlton CL, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Viruses Causing Acute Respiratory Tract Infections. Clinical Microbiology Reviews. 2019;32(1). Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6302358/
12. Mourya DT, et al. Establishment of Biosafety Level-3 (BSL-3) laboratory: Important criteria to consider while designing, constructing, commissioning & operating the facility in Indian setting. 2014;140(2):171–183. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4216491/
13. Bilchenko OS. Etiolohiya i faktory ryzyku pozalikarnyanoyi pnevmoniyi (Etiology and risk factors for community-acquired pneumonia). Visnyk Kharkivskogo natsionalnogo universytetu imeni V.N. Karazina. 2016;27:99–105.
14. Pertseva TO, Kireyeva TV, Byelosludtseva KO. Masky tyazhkykh pnevmoniy: alhorytmy diahnostyky ta likuvannya: praktychnyy posibnyk (Masks of severe pneumonia: algorithms for diagnosis and treatment: a practical guide). Dnipropetrovs'k: «Herda». 2014;64 s. Available at: http://repo.dma.dp.ua/338/1/Pertseva_masky tyazhkykh pnevmoniy.pdf
15. Couturier MR, Graf EH, Griffin AT. Urine Antigen Tests for the Diagnosis of Respiratory Infections Legionellosis, Histoplasmosis, Pneumococcal Pneumonia. Clin Lab Med. 2014;34:219–236. Available at: https://www.labmed.theclinics.com/article/S0272-2712(14)00016-X/pdf
16. Abdurashytov MA, Netesova NA. Opredeleniye virusnykh nukleynovykh kislot v krovi cheloveka. BYOpreparaty. Profylaktika, dyagnostika, lecheniye (Determination of viral nucleic acids in human blood. BIOpreparations. Prevention, diagnosis, treatment). 2018;18(4)208–215. Available at: https://cyberleninka.ru/article/n/opredelenie-virusnyh-nukleinovyh-kislot-v-krovi-cheloveka/viewer
17. Shemedyuk NP. Kharakterystyka mozhlyvostey imunofermentnogo analizu (Characteristics of enzyme-linked immunosorbent assay). Naukovyy visnyk LNUVMBT imeni S.Z. Gzhytskogo. 2016;18 (66):212–216.
18. Dzyublyk IV, Solovyov SO, Kovalyuk OV. Etiologichna diagnostyka gostrykh virusnykh infektsiy: rol u suchasniy systemi okhorony zdorovya ta ekonomichna efektyvnist (Etiological diagnosis of acute viral infections: role in the modern health care system and cost-effectiveness). Infektsiyni khvoroby. 2018;1(91):46–53.
19. Kalachnyuk MS, ta in. Umovy provedennya polimeraznoyi lantsyugovoyi reaktsiyi u laboratorniy praktytsi (metodychni aspekty) (Conditions for polymerase chain reaction in laboratory practice (methodological aspects)). Biologiya tvaryn. 2012;14(№1–2):660–667.
20. Pertseva TA. Legionelleznaya pnevmoniya: problemy klinycheskoy praktyky na segodnya (Legionella pneumonia: problems of clinical practice today). Aktualni pytannya medychnoyi nauky ta praktyky. 2016;1(83):118–130. Available at: http://repo.dma.dp.ua/744/1/img168%20%281%29.pdf
21. Lee MS, et al. Guideline for Antibiotic Use in Adults with Community-acquired Pneumonia. Infect Chemother. 2018;50(2):160–198. Available at: https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3947/ic.2018.50.2.160
22. Makarova YuA, et al. Izotermicheskaya petlevaya amplifikatsiya: effektivnyy metod ekspress-diagnostiki v onkologii (Isothermal loop amplification: an effective method of express diagnostics in oncology). Onkourologiya. 2018;14:88–99. Available at: https://labvita.com.ua/interesting/articles/izotermichna-petliova-amplifikaciya/
23. Wong YP, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. J Appl Microbiol. 2018;124(3):626–643. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7167136/
24. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. Clinical Chemistry. 2015;61(1):100–111. Available at: https://academic.oup.com/clinchem/article/61/1/100/5611480