

УДК 616.24-002-022-07

Современные подходы к диагностике атипичных пневмоний

И.С. Тартаковский

Кафедра инфектологии медико-профилактического факультета профессионального последипломного образования Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова

Возбудители атипичных пневмоний – микоплазмы, легионеллы, хламидии, *Coxiella burnetii* (возбудитель лихорадки Ку) – играют заметную роль в инфекционной патологии человека. Несмотря на существенные различия в биологии возбудителей, эпидемиологии и клинике инфекционного процесса, данную группу микроорганизмов объединяют устойчивость к пенициллинам и другим бета-лактамам, а также общие подходы к лабораторной диагностике. Наибольшее значение для лабораторной диагностики атипичных пневмоний в настоящее время приобретают иммунологические и молекулярно-биологические методы (иммуноферментный анализ, иммунофлюоресценция, полимеразная цепная реакция). Носительство и персистенция,

характерные для инфекций вызываемых данной группой возбудителей, обуславливают необходимость особенно тщательной интерпретации серологических реакций и результатов молекулярно-биологических методов исследования. Дальнейшее совершенствование лабораторной диагностики атипичных пневмоний связано с поиском новых специфичных антигенных и нуклеотидных маркеров возбудителей, постановкой этиологического диагноза в начальной фазе заболевания, снижением стоимости наиболее чувствительных диагностических тест-систем.

Ключевые слова: атипичные пневмонии, микоплазмы, легионеллы, хламидии, коксиелла, диагностика.

Modern Approaches to Diagnosis of Atypical Pneumonia

I.S. Tartakovski

Department of Infectious Diseases, Faculty of Professional Postgraduate education, Moscow I.M. Sechenov State Medical Academy

Pathogens causing “atypical pneumonias” – mycoplasmas, legionellae, clamydiae, coxiellae play significant role in human infections. In spite of considerable differences in biology, epidemiology and clinical presentations these pathogens can be grouped because of resistance to penicillins and other beta-lactams and similar approaches to laboratory diagnosis. For the time been immunological and molecular methods are the most important for the diagnosis of atypical pneumonia. But because of possible asymptomatic carriage and persistence

it is very important to correctly interpret the results obtained with these methods. The further improvement of laboratory diagnosis of “atypical pneumonia” is based on establishment of new specific antigenic and nucleotide markers; reduction of diagnosis time, increase of sensitivity and specificity and decrease of cost.

Key words: atypical pneumonia, Mycoplasma, Legionella, Chlamydia, Chlamydoiphila, Coxiella, diagnostics.

Контактный адрес:

И.С. Тартаковский

119881, г. Москва, ул. Б. Пироговская, д. 2/6. Кафедра инфектологии медико-профилактического факультета профессионального последипломного образования ММА им. И.М. Сеченова.

Тел.: (095) 193-6130. Факс: (095) 193-5597.

Термин “первичные атипичные пневмонии” вошел в практику в 40-е годы XX века и использовался для характеристики пневмоний, плохо поддающихся лечению сульфаниламидными препаратами и пенициллином. Первым этиологическим агентом данной группы был выделен из мокроты больного пневмонией фильтрующийся возбудитель, названный агентом Итона. Предположение о вирусной природе данной группы пневмоний плохо согласовывалось с чувствительностью к тетрациклину, а выделение агента Итона на искусственной питательной среде доказало, что возбудитель не является вирусом. Агент Итона был отнесен к группе плевропневмониеподобных микроорганизмов, известных еще с 1898 г., после выделения их от крупного рогатого скота. В 1963 г. название агент Итона было заменено на современное видовое – *Mycoplasma pneumoniae* [4, 6].

В последние годы группа “атипичных пневмоний” пополнилась очень разными по своей биологии возбудителями, не имеющими ничего общего с позиций таксономии прокариотов (табл. 1). Вызываемые ими инфекции существенно отличаются по клинике, эпидемиологии, условиям циркуляции возбудителя и путям их передачи. Несмотря на эти обстоятельства, термин “атипичные пневмонии”, не являясь строго научным определением, входящим в Международную классификацию болезней, достаточно прочно вошел в клиническую и микробиологическую практику [8].

Группу возбудителей атипичных пневмоний объединяет устойчивость к пенициллину и другим бета-лактамам, а жизнеспособность самого термина связана с широким распространением данных инфекций.

Оценка эффективности любого нового препарата для антимикробной терапии пневмоний практически невозможна без анализа его действия против возбудителей атипичных пневмоний.

Наконец, общими для атипичных пневмоний являются методические подходы к лабораторной диагностике, связанные с длительным и требующим специальной подготовки выделением культу-

ры возбудителя и ведущей в настоящее время ролью иммунологических методов диагностики [3].

Возбудители атипичных пневмоний и их этиологическое значение

Хотя возбудитель респираторного микоплазмоза был выделен в 40-е годы, активное изучение биологии возбудителя и эпидемиологии инфекции были начаты только в 60-е годы. Микоплазменные пневмонии, по данным ВОЗ и ряда отечественных исследователей, составляют 10–20% от общего числа пневмоний, а в изолированных и полуизолированных коллективах (военнослужащие, школьники, воспитанники детских учреждений) – до 50% [4, 6, 21]. Скопление людей, наличие тесных и длительных контактов создают благоприятные условия для циркуляции возбудителя, распространяющегося воздушно-капельным путем, что приводит к высокому уровню инфицирования членов коллектива. Наиболее часто клинически выявляется микоплазменная пневмония средней тяжести.

Данные серологических исследований свидетельствуют о значительном числе бессимптомных форм или носительстве. Источником инфекции могут быть как больные, так и люди с бессимптомными формами микоплазмоза. Эпидемии респираторного микоплазмоза могут развиваться медленно с постепенным вовлечением в эпидемический процесс отдельных членов коллектива в течение 9, 18 и более месяцев.

Микоплазмы являются самыми мелкими по размерам среди внеклеточно культивируемых патогенных микроорганизмов. К основным биологическим особенностям микоплазм, определяющим их место среди других прокариотов, а также во многом определяющим их эпидемиологическое значение и подходы к диагностике и лечению, относятся:

1) отсутствие ригидной клеточной стенки, что обуславливает полиморфизм клеток; резистентность к различным агентам, подавляющим синтез клеточной стенки, прежде всего к пенициллину и другим бета-лактамам;

2) малый размер генома – около 500 мДа (наименьший для прокариотов), что обуславливает ограниченность биосинтетических возможностей и высокие требования к условиям культивирования;

3) микоплазмы – уникальные мембранные паразиты, способные к длительной персистенции; прочно связываясь с мембраной инфицированной эукариотической клетки, микоплазмы “ускользают” от фагоцитоза. Способность паразитировать на мембране эукариотической клетки исключительно важна для понимания патогенеза инфекции, вызванной *M. pneumoniae*.

Таблица 1. Основные возбудители атипичных пневмоний

Микоплазмы	<i>M. pneumoniae</i>
Хламидии	<i>C. pneumoniae</i> <i>C. trachomatis</i> <i>C. psittaci</i>
Легионеллы	<i>L. pneumophila</i>
Возбудитель лихорадки Ку	<i>C. burnetii</i>

Таблица 2. Лабораторная диагностика инфекций, вызванных *M. pneumoniae*

Методы	Цель	Применяемые тесты
Культуральные	Выделение возбудителя	Выращивание на различных питательных средах
Иммунологические	Выявление антигена в крови	Реакция агрегат-гемагглютинации
	Выявление антител в крови	ИФА, РСК, РНГА
	Выявление антигенов в отделяемом зева, бронхов	
Молекулярно-биологические	Выявление специфических нуклеотидных последовательностей	ДНК (РНК)-зонды, ПЦР с праймерами гена белка P-1 или 16S рибосомальной РНК

Возбудитель легионеллеза, *Legionella pneumophila*, впервые выделенный и идентифицированный в 1977 г. после крупной эпидемической вспышки пневмоний в Филадельфии (США) с 15% летальным исходом, активно изучается в последние годы. Частота легионеллезной инфекции среди внебольничных пневмоний варьирует от 1 до 15% [3, 5, 15]. Более низкий процент свидетельствует об отсутствии эффективной диагностики, более высокий – о наличии эндемичных очагов и благоприятных условий для аэрогенного заражения легионеллами.

L. pneumophila – распространенный в природе гидрофильный микроорганизм, в природных водоемах паразитирующий в амебах и инфузориях. В системах водоснабжения, кондиционирования воздуха, иных инженерно-технических системах, связанных с циркуляцией воды, происходит колонизация легионеллами различных металлических, резиновых и синтетических поверхностей. При высокой концентрации возбудителя в таких системах в сочетании с возможностью аэрозольного распространения весьма вероятно возникновение легионеллезной инфекции.

Легионеллез не контагиозен, то есть заражение от человека практически невозможно. Помимо основного аэрозольного пути заражения возможна и аспирация как путь передачи при внутрибольничных легионеллезных пневмониях у больных на фоне иммуносупрессии. Подозрение на легионеллезную инфекцию возникает в случае острой, тяжелой, как правило, лобарной пневмонии, плохо поддающейся лечению пенициллинами и другими бета-лактамами.

L. pneumophila – единственный возбудитель атипичных пневмоний, для которого отсутствуют данные о носительстве и персистенции.

L. pneumophila – грамтрицательная палочка размером 0,5–0,7 × 2,5 мкм, не образующая спор и капсул. Легионеллы не ферментируют углеводы, будучи хемоавтотрофами, в качестве источника уг-

лерода и энергии используют аминокислоты. В организме человека легионеллы размножаются преимущественно в альвеолярных макрофагах, полиморфно-ядерных нейтрофилах и моноцитах крови.

Биология легионелл не столь своеобразна, как у хламидий и микоплазм. Будучи факультативными внутриклеточными паразитами, легионеллы не растут на обычных питательных средах, используемых в клинической микробиологии, таких, как кровяной агар и агар МакКонки, что связано с потребностью возбудителя в L-цистеине и растворимом пиррофосфате железа (Fe^{+++}) и высокими требованиями к рН среды – 6,95.

Стандартная среда для выделения легионелл – агар BCYE α , который содержит дрожжевой экстракт, L-цистеин, соединения железа, α -кетоглутарат и ACES [N-(2-ацетиамидо)-2-аминоэтансульфоновая кислота]-буфер.

Хламидии – облигатные внутриклеточные паразиты. В инфекционной патологии человека играют заметную роль в качестве возбудителя трахомы и паратрахомы, урогенитальных инфекций, респираторных заболеваний и пневмоний, а также ряда других заболеваний. В 90-е годы наибольший научный интерес проявился в выяснении значимости хламидий в этиологии пневмоний. Это обусловлено открытием вида *Chlamydia pneumoniae* (или по измененной недавно классификации – *Chlamydo-philum pneumoniae*), который до 1989 г. описывали как TWAR [2, 10].

Эпидемиологические исследования в США, Финляндии и других странах свидетельствуют, что *C. pneumoniae* вызывает около 10–12% пневмоний [21]. Для инфекции характерно клиническое течение средней тяжести, но возможно и тяжелое с летальным исходом. Тяжелое течение чаще наблюдается у пожилых и лиц с хроническими заболеваниями. Как и *Mycoplasma pneumoniae*, *C. pneumoniae* нередко вызывает эпидемические вспышки в закрытых коллективах. Помимо пневмоний возбуди-

тель вызывает фарингиты, бронхиты, синуситы и гриппоподобные заболевания. Другим видам хламидий также принадлежит заметная роль в этиологии пневмоний (*C. trachomatis*, возбудитель урогенитального хламидиоза вызывает до 20% пневмоний у новорожденных).

Если *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* вызывают антропонозный хламидиоз, то вид *C. psittaci* является возбудителем зоонозных хламидиозов, передающихся человеку при контакте с птицами. В клинической картине орнитоза ведущее место также принадлежит пневмонии. Количество орнитозных пневмоний в последние годы невелико – 1–3%, но достаточно стабильно.

Являясь облигатными внутриклеточными паразитами, хламидии не могут размножаться вне клеток макроорганизма. Поэтому они не могут быть выделены на искусственной питательной среде.

Для диагностики и лечения хламидиозов имеют значение следующие особенности их биологии.

1. Хламидии по строению сходны с грамотрицательными бактериями, имеют цитоплазматическую мембрану и клеточную стенку.

2. В клетках макроорганизма хламидии образуют цитоплазматические включения, состоящие в основном из 2 форм микробных клеток: элементарных телец диаметром 0,25–0,35 мКм (инфекционные формы) и ретикулярных телец (вегетативные формы) диаметром 0,5–1 мКм. Элементарные тельца адаптированы к внеклеточному выживанию, метаболически малоактивны. Ретикулярные тельца быстро разрушаются во внешней среде, чувствительны к антибиотикам, в клетках хозяина проявляют высокую метаболическую активность.

3. Уникальный цикл развития хламидий связан с проникновением в клетку путем фагоцитоза элементарных телец, которые через переходные формы преобразуются в ретикулярные тельца. Размножившиеся путем бинарного деления ретикулярные тельца преобразуются в элементарные тельца нового поколения. Цикл, продолжающийся 40–72 ч, завершается разрывом мембраны включений и клетки-хозяина. Содержимое включений поступает во внеклеточную среду, и элементарные тельца заражают новые клетки. При диагностических исследованиях хламидии выявляют внутри пораженных клеток в виде включений либо вне клеток в виде элементарных и ретикулярных телец.

4. Помимо продуктивного цикла для хламидий возможна и длительная их персистенция без выраженной симптоматики.

Лихорадка Ку, известная с конца 30-х годов, также может быть отнесена к группе атипичных пневмоний [1, 16]. Хотя возбудитель *Coxiella burnetii* вы-

зывает не более 1–3% от числа пневмоний, в эндемичных районах дифференциальная диагностика Ку-лихорадки необходима для представления о реальной этиологической структуре и эффективной терапии пневмоний.

В эндемичных для лихорадки Ку регионах частота вызываемых ею пневмоний значительно выше и может достигать 7–10% (провинция Баскония в Испании, Новая Шотландия в Канаде, Южная Франция) [16, 23].

Основным источником *C. burnetii* для человека является домашний крупный и мелкий рогатый скот. Для лихорадки Ку характерны множественные пути передачи: аспирационный, контактный, алиментарный, трансмиссивный, но в основном заражение происходит при вдыхании инфицированных аэрозолей.

Главные факторы риска связаны с уходом за животными и обработкой продуктов животноводства. *C. burnetii* – облигатный внутриклеточный паразит со строением клеточной стенки, типичной для грамотрицательных бактерий. Для морфологии коксилл характерен выраженный плеоморфизм с преобладанием бациллярных форм размером 0,25 × 1,5 нм. У *C. burnetii* описаны две антигенные фазы, различающиеся антигенными свойствами. *C. burnetii* в естественных условиях циркуляции принадлежит к фазе I, в начальный период инфекции переходит в антигенную фазу II.

Методы диагностики атипичных пневмоний

Для лабораторной диагностики атипичных пневмоний можно использовать 4 группы методов:

1) морфологические, основанные на выявлении характерных морфологических структур возбудителя непосредственно в клиническом материале;

2) культуральные, основанные на выделении возбудителя на питательной среде, культуре клеток или куриных эмбрионах;

3) иммунологические, основанные на выявлении антигенов возбудителя и антител к ним;

4) молекулярно-биологические, основанные на определении специфичных нуклеотидных последовательностей.

Для выделения *M. pneumoniae* из клинического материала (мокрота, плевральная жидкость, легочная ткань, смывы с задней стенки глотки) требуются исключительно богатые среды, содержащие все предшественники, необходимые для синтеза макромолекул, способные обеспечить микоплазмы источниками энергии, удовлетворяющие их потребность в стеролах и фосфолипидах.

Осмотическое давление среды для лишенных ригидной клеточной стенки микоплазм, достигае-

мое за счет ионов калия и натрия, также является необходимым условием их роста. Несмотря на столь богатый состав среды, *M. pneumoniae* растет крайне медленно, требует 7–14 сут, а часто и гораздо более длительных сроков инкубации. Богатый состав среды и длительные сроки инкубации могут привести к контаминации посева другими, менее требовательными к условиям культивирования, ахлеплазмами и микоплазмами. Наконец, с учетом способности *M. pneumoniae* к персистенции ее выделение не является 100% подтверждением острой микоплазменной инфекции [21, 29].

Поэтому в практических лабораториях для диагностики *M. pneumoniae*-инфекции наибольшее распространение получили иммунологические методы, основанные на выявлении в клиническом материале микоплазменных антигенов или определения специфических антител к ним.

Наиболее распространенной и апробированной является реакция иммунофлюоресценции, позволяющая выявлять микоплазменные антигены в мазках из носоглотки, мокроты и другом клиническом материале. Данный метод обладает высокой специфичностью и значительно более высокой чувствительностью, чем культуральные методы. Антиген *M. pneumoniae* может быть обнаружен также в сыворотке крови больных. Для этого используют реакцию агрегат-гемагглютинации и иммуноферментный анализ [6, 7].

Реакция агрегат-гемагглютинации позволяет выявить наличие антигена микоплазм в сыворотке крови больного в концентрации 0,001–0,0001 мг/л. Особенность реакции заключается в том, что для сенсибилизации эритроцитов используют агрегированные глутаратаальдегидом белки иммунной сыворотки. При этом антитела вводятся в состав трехмерных белковых комплексов, вследствие чего часть активных центров антител отделяется от поверхности эритроцита и становится более доступной для детерминант антигена. Минимальный диагностический титр составляет 1:8. Иммуноферментный метод позволяет выявлять антиген в сыворотке крови в минимальном диагностическом титре 1:200.

Исключительно важным для диагностики *M. pneumoniae* инфекции является исследование на наличие специфических антител к гликолипидному или поверхностному белковому антигену микоплазм [21]. Диагностическое значение имеет нарастание титров антител в динамике болезни в 4 и более раз в парных сыворотках крови. Для выявления антител используют реакцию связывания комплемента (РСК), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) и иммуноферментный анализ (ИФА). Диа-

гностическое нарастание титров антител обычно удается выявить не ранее чем через 2–3 нед болезни. Ряд современных тест-систем позволяет выявлять специфические IgM антитела в ранние сроки болезни [13, 14].

Для иммунологической диагностики *M. pneumoniae*-инфекции существенно и то обстоятельство, что при затяжной вялотекущей микоплазменной пневмонии значительное количество антигенов микоплазм может находиться в составе циркулирующих иммунных комплексов. Диссоциация таких комплексов в сыворотке крови с помощью буфера (рН 2,4) позволяет выявлять антигены микоплазм в высоких титрах.

Следует учитывать, что антигенное родство *M. pneumoniae* с тканями человека и животных, оказывая прямое воздействие на иммунный ответ хозяина, может не только вызывать аутоиммунную реакцию, но и приводить к ложноположительным результатам при серологических исследованиях.

В последние годы активно разрабатываются молекулярно-биологические методы, основанные на выявлении специфичных нуклеотидных последовательностей ДНК микоплазм. РНК-зонды или ПЦР-диагностические тест-системы выявляют обычно нуклеотидные последовательности 16S рРНК или гена, кодирующего синтез белка адгезии р1 [26, 11]. Методы отличаются высокой чувствительностью и теоретически позволяют выявлять единичные клетки микоплазм. Практическое применение этих методов требует особо тщательной постановки реакции с учетом возможной контаминации клинического материала, носительства или персистенции возбудителя. Вследствие этого методы не всегда отличаются высокой специфичностью.

Бактериологическое выделение культуры *L. pneumophila* из клинического материала – наиболее точное подтверждение этиологии легионеллезной пневмонии. Выделение и идентификация культуры *L. pneumophila* из клинического материала занимает не менее 5–7 дней (табл. 3) [3, 5].

Хотя выделение культуры является наиболее чувствительным и специфичным методом диагностики легионеллеза, чаще используются иммунологические методы.

Основным серологическим методом диагностики легионеллеза служит непрямо́я иммунофлюоресценция, позволяющая выявлять диагностическое нарастание титров антител в сыворотке крови больных. Положительный диагноз ставится по не менее чем 4-кратному нарастанию титров антител у реконвалесцентов. Отсутствие носительства или персистенции легионелл повышает его достоверность для подтверждения острой легионеллезной

инфекции. Однако при этом диагностика носит в основном ретроспективный характер из-за нарастания титров антител не ранее 14–21-го дня, что заставляет активно использовать методы экспресс-диагностики [27].

Метод прямой иммунофлюоресценции позволяет обнаружить возбудитель в клиническом материале (материал бронхоскопии, биопсии, плевральный экссудат) в острый период заболевания. К сожалению, применение высокоспецифичного и чувствительного метода связано с применением инвазивных процедур для получения клинического материала, так как в мокроте возбудитель легионеллеза выявляют редко. В связи с этим в последние годы для экспресс-диагностики легионеллеза активно используют ИФА, позволяющий выявить растворимый антиген легионелл в моче в острой фазе заболевания. Метод специфичен только для выявления антигенов *L. pneumophila* серогруппы 1 [18]. Штаммы *L. pneumophila* серогруппы 1 вызывают не менее 75% случаев легионеллезной пневмонии, хотя известны еще 14 серогрупп *L. pneumophila*.

ДНК-зонды и амплификационные тест-системы (ПЦР) также используют для диагностики легио-

неллеза. В качестве клинических образцов исследуют материал из нижней части респираторного тракта. При этом специфичность метода не выше уровня, полученного при прямой иммунофлюоресценции [20, 22].

Для лабораторной диагностики хламидиозов используют морфологические, культуральные, иммунологические и молекулярно-биологические методы исследования (табл. 4) [2].

Морфологические методы, основанные на выявлении включений хламидий в мазках-отпечатках, окрашенных по Романовскому–Гимзе и раствором Люоля, имеют лишь историческое значение. Культуральные методы, основанные на заражении монослоя клеток материалом, полученным от больных, получили широкое распространение для выделения *C. trachomatis*. Через 48–60 ч, соответственно циклу развития хламидий, клетки фиксируют и окрашивают или применяют метод иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антихламидийных антител. Для *C. pneumoniae* применение данного метода не является столь рутинной процедурой и возможно только в специализированных лабораториях, где используется в научных це-

Таблица 3. Лабораторная диагностика легионеллезной пневмонии

Методы	Цель	Применение
Культуральные	Выделение возбудителя	Высев на питательные среды – ВСУЕα агар, угольно-дрожжевой агар, легионеллобакта-агар
Иммунологические	Выявление антител в крови	Непрямая иммунофлюоресценция
	Выявление антигена в клиническом материале	Прямая иммунофлюоресценция
Молекулярно-биологические	Выявление растворимого антигена в моче	Иммуоферментный метод
	Выявление специфических нуклеотидных последовательностей	ДНК (РНК)-зонды ПЦР с праймерами <i>tir</i> гена, гена 5S или 16S рРНК

Таблица 4. Лабораторная диагностика хламидийных пневмоний

Методы	Цель	Применяемые тесты
Морфологические	Выявление морфологических структур возбудителя	Окраска препаратов по Романовскому–Гимзе и др.
Культуральные	Выделение возбудителя	Заражение монослоя культуры клеток McCoу, Hela, La 229
Иммунологические	Выявление антител в крови к <i>C. trachomatis</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i>	РИФ, РСК, РНГА
	Выявление классов IgG, IgM, IgA к <i>C. trachomatis</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i>	РИФ, ИФА
	Выявление антигена возбудителя в клиническом материале	РИФ
Молекулярно-биологические	Выявление специфических нуклеотидных последовательностей	ДНК (РНК)-зонды, ПЦР с праймерами гена главного белка внешней мембраны хламидий, гена 16S рРНК

лях [21, 28]. В диагностике орнитоза применяется выделение возбудителя на культуре клеток.

Иммунологические методы получили наибольшее распространение для диагностики хламидийных пневмоний [2]. Традиционно – это методы РСК, РНГА, иммунофлюоресценция, а в последнее время – и ИФА. Методы с использованием антикумов на основе родо- и видоспецифических антигенов не отличаются своеобразием. Широкое распространение носительства и персистенции хламидий, наличие трех видов возбудителей, имеющих общий родоспецифический антиген, значительно затрудняют интерпретацию результатов серологической диагностики. Лишь выявление антител в высоких титрах 1:64, 1:256 к одному из видов хламидий при постановке реакции с антигенами трех видов может с высокой степенью достоверности указывать на инфекцию одним из видов хламидий.

Отрицательные результаты серологических тестов также не исключают наличия острого процесса или перенесенной инфекции. Поэтому для хламидийной инфекции особо важным представляется определение классов иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA к антигенным эпитопам главного белка внешней мембраны [17, 28]. Определение ранних IgM-антител наиболее достоверно для подтверждения острой фазы хламидийной инфекции и может быть использовано для каждого вида хламидий. Двух- или трехкратное снижение титров классов иммуноглобулинов может служить косвенным подтверждением успешной терапии хламидийной инфекции.

Выявление возбудителя хламидий с помощью прямой иммунофлюоресценции в отделяемом респираторного тракта отличается достаточно высокой чувствительностью и специфичностью для *C. trachomatis*. Аналогичный метод для выявления *C. pneumoniae* с помощью моноклональных антител к видоспецифическому антигену менее эффективен из-за меньшей концентрации возбудителя и низкой

(50%) чувствительности метода [21]. Не выдерживают критики и попытки опосредованной диагностики *C. pneumoniae* с помощью моноклональных антител к родоспецифическому антигену хламидий и видоспецифическому антигену *C. pneumoniae*, когда положительный результат с родоспецифическим и отрицательный с видоспецифическим антигенами пытаются интерпретировать как диагноз *C. pneumoniae*-инфекции.

Метод ПЦР с помощью праймеров на основе нуклеотидных последовательностей гена белков внешней мембраны позволяет быстро выявлять все 3 вида возбудителя в клиническом материале. Причем чувствительность метода на 25–30% превышает чувствительность культурального метода [19]. Однако специфичность метода оценить гораздо сложнее из-за возможности бессимптомного носительства или выявления фрагментов ДНК длительное время после острой фазы хламидийной инфекции.

При диагностике лихорадки Ку сочетание культуральных и морфологических методов также возможно лишь в специализированных риккетсиологических лабораториях (табл. 5). В практических учреждениях наиболее доступна серологическая диагностика с помощью РСК или РИФ. В острой фазе заболевания выявляют антитела к антигену II фазы *C. burnetii*. Антитела к антигену I фазы выявляют редко, но при обострении хронических форм они могут достигать высоких титров [1, 16]. Для экспресс-диагностики применяют иммунофлюоресценцию, иммуноферментный анализ или ПЦР с праймерами 16S – 23S рРНК или плазмиды Q рН1, позволяющие выявить возбудитель в крови, мокроте и других клинических образцах [25, 30].

Проблемы и перспективы диагностики атипичных пневмоний

Приведенные данные подтверждают заметное место возбудителей атипичных пневмоний в ин-

Таблица 5. Лабораторная диагностика лихорадки Ку

Методы	Цель	Применяемые тесты
Морфологические	Выявление морфологических структур возбудителя	Окраска препаратов по Романовскому–Гимзе и др.
Культуральные	Выделение возбудителя	Заражение куриных эмбрионов или морских свинок
Иммунологические	Выявление антител в крови: к антигену II фазы <i>C. burnetii</i> к антигену I фазы <i>C. burnetii</i>	РИФ, РСК
	Выявление антигена в крови, моче, мокроте	ИФА
Молекулярно-биологические	Выявление специфических нуклеотидных последовательностей	ПЦР с праймерами гена 16-23S рРНК, плазмиды Q рН1 <i>C. burnetii</i>

фекционной патологии человека и свидетельствуют об общности методических подходов к диагностике столь гетерогенной группы инфекций. Значительный прогресс в разработке иммунологических и молекулярно-биологических методов позволяет эффективно осуществлять комплексную дифференциальную диагностику атипичных пневмоний не только в специализированных научных центрах, но и в практических бактериологических или иммунологических лабораториях здравоохранения. При этом необходимо учитывать следующие общие проблемы, возникающие при диагностике данной группы инфекций [3, 9].

1. Носительство и персистенция, характерные для микоплазм, хламидий и коксиилл, не всегда позволяют считать окончательным подтверждением диагноза даже выделение культуры возбудителя, не говоря уже о выявлении суммарных антител или нуклеотидных последовательностей.

2. При пневмониях может иметь место смешанная инфекция. По нашим данным, до 20% выявленных пневмоний имеют смешанную этиологию с участием возбудителей атипичных пневмоний [27]. Описаны ассоциированные инфекции *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* или *L. pneumophila* и *M. pneumoniae*. В данном случае общность методических подходов облегчает правильный диагноз и выбор полиэтиотропного лечения.

3. Перекрестно реагирующие антитела и последовательности нуклеотидов часто ограничивают возможности высокочувствительных и специфичных методов диагностики. В качестве примера можно привести метод ИФА для выявления растворимого антигена *L. pneumophila* в моче. Дорогостоящие тест-системы фирм "Binax" или "Biotest" позволяют эффективно выявлять антиген только 1-й серогруппы *L. pneumophila*. Хотя более 70% случаев легионеллезных пневмоний связаны именно с этой серогруппой, попытки создать аналогичную тест-систему для остальных 14 серогрупп *L. pneumophila* пока безуспешны из-за перекрестных серологических реакций.

4. Высокие требования к условиям постановки реакций, оборудованию, стерильности, подготовке персонала и т. д. необходимо соблюдать при применении иммунологических и молекулярно-биологических методов диагностики. В противном случае достоинства данной группы могут дать обратный

результат – высокий процент ложноположительных реакций. Контаминация исследуемого материала одной клеткой постороннего возбудителя при постановке ПЦР может привести к неправильному диагнозу.

На наш взгляд, применение двух взаимодополняющих методов является оптимальным подходом для подтверждения диагноза инфекции, вызванной любым возбудителем атипичных пневмоний. Так, выявление высокого уровня антител к *M. pneumoniae* в сыворотке крови в сочетании с выявлением антигена в крови в реакции агрегат-гемагглютинации или его обнаружением в отделяемом респираторного тракта методом иммунофлюоресценции или ПЦР позволяет достоверно подтвердить диагноз *M. pneumoniae*-инфекции. Сравнительные исследования показывают эффективность такого подхода и для диагностики хламидийных пневмоний [12, 13, 20, 28, 29].

При выборе диагностических препаратов существенное значение имеет и экономический фактор. В ряде случаев применение двух простых и недорогих взаимодополняющих методов может быть более эффективным, чем использование дорогостоящей тест-системы с высоким уровнем чувствительности и специфичности. Так, выявление антител в высоких титрах к *L. pneumophila* в непрямой иммунофлюоресценции в сочетании с выявлением возбудителя в отделяемом респираторного тракта в прямой иммунофлюоресценции более надежно для подтверждения легионеллеза, чем применение более дорогостоящих методов ПЦР или иммуноферментного анализа.

Для дальнейшего совершенствования методической базы диагностики атипичных пневмоний наибольшее значение имеют:

- 1) поиск новых высокоспецифичных антигенных и нуклеотидных маркеров, позволяющих избежать перекрестных реакций на уровне вида или серовара возбудителя;
- 2) совершенствование методов, выявляющих острую фазу заболевания (определение IgM антител при хламидийной и микоплазменной инфекциях, определение растворимого антигена в моче при легионеллезе и т. д.);
- 3) снижение стоимости наиболее чувствительных и специфичных тест-систем, лимитирующей их широкое использование в практических лабораториях.

Л и т е р а т у р а

1. Дайтер А.Б., Тарасевич И.В. Лихорадка Ку. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней. 1993. с.333-42.

2. Мартынова В.Р., Колкова Н.И., Шаткин А.А. Хламидии и хламидиозы: клиника, биология и диагностика. Рос мед вести 1997;3:49-55.
3. Покровский В.И., Прозоровский С.В., Малеев В.В.,

- Тартаковский И.С. Этиологическая диагностика и этиотропная терапия острых пневмоний. М: Медицина; 1995.
4. Прозоровский С.В., Васильева В.И., Покровский В.И. Микоплазма пневмонии – инфекция. М: Медицина; 1978.
 5. Прозоровский С.В., Покровский В.И., Тартаковский И.С. Болезнь легионеров (легионеллез). М: Медицина; 1984.
 6. Прозоровский С.В., Раковская И.В., Вульфович Ю.В. Медицинская микоплазмология. М: Медицина; 1995.
 7. Раковская И.В., Горина Л.Г. Лабораторная диагностика микоплазмозов человека. Клиническая диагностика 1999;11:6-7.
 8. Синопальников А.И. Рациональная антибактериальная терапия пневмоний. Рос мед вести 1996;1:5-13.
 9. Тартаковский И.С., Прозоровский С.В. Оппортунистические инфекции – новая область клинической микробиологии. Рос мед вести 1997;1:46-51.
 10. Эйдельштейн И.А. Фундаментальные изменения в классификации хламидий и родственных им микроорганизмов порядка *Chlamydiales*. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 1999;1:5-11.
 11. Abele-Horn M., Busch U., Nitscheo, et al. Molecular approaches to diagnosis of pulmonary diseases due to *M. pneumoniae*. J Clin Microbiol 1998;36:548-51.
 12. Dean D., Ferrero D., McCarthy M. Comparison of performance and cost-effectiveness of direct fluorescent-antibody, Ligase chain reaction and PCR assay for verification of chlamydial enzyme immunoassay results for a population with a low to moderate prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection. J Clin Microbiol 1998;36:94-9.
 13. Dorigo-Zetsma L.W., Zaat S.A., Wertheim-von Dillen P.M.E., et al. Comparison of PCR, culture and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infection in children. J Clin Microbiol 1999;37:14-7.
 14. Duffy M.E., Whithear K.G., et al. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G reactive with a recombinant protein-expressed for the gene encoding the 116 KD protein of *M. pneumoniae*. J Clin Microbiol 1999;37:1024-9.
 15. Edelstein P.H., Meyer R.D. *Legionella pneumophila*. In: L.E. Remington ed. Respiratory infections: Diagnosis and Management. New York: Raven Press Ltd; 1994. p.455-83.
 16. Fournies P.E., Marrie T.L., Raoult D. Diagnosis of Q fever. J Clin Microbiol 1999;36:1823-34.
 17. Grondahl B., Papper W., Hoppe A., et al. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR feasibility study. J Clin Microbiol 1999;37:1-7.
 18. Harrison T., Uldum S., Tartakovskii I.S., et al. A multi-center evaluation of the biotest legionella urinary antigen EIA. Clin Microbiol Infect 1998;4:359-65.
 19. Jantos C.A., Roggendorf R., Wupperman T.N., et al. Rapid detection of *Chlamydia pneumoniae* by PCR. J Clin Microbiol 1998;36:1890-94.
 20. Jaulhac B., Reyrolle M., Sodahlou Y.K., et al. Comparison of sample preparation methods for detection of *L. pneumophila* in culture positive bronchoalveolar lavage fluids by PCR. J Clin Microbiol 1998;36:2120-2.
 21. Kalin M. Atypical pneumonia agents in Scandinavia clinical importance and diagnostic aspects. In: B.P. Berdal ed. Legionella infection and atypical pneumonias. Oslo, Norway; 1996. p.139-44.
 22. Lindsday D., Abraham S.W.H., Fallou R.J., et al. Detection of mip gene by PCR for diagnosis of Legionnaires Disease. J Clin Microbiol 1994;32:3068-9.
 23. Serebrov V., Kazar J., Novkiriski N., et al. Q-fever in Bulgaria and Slovakia. Emerg Infect Dis 1999;5:1999-2003.
 24. Sinopalnikov A.I., Tartakovskii I.S. Etiologic structure of community-acquired pneumonias. EWGLI-13. Finland, Helsinki; 1998. p.65.
 25. Stein A., Ravult D. Detection of *C. burnetii* by DNA amplification using PCR. J Clin Microbiol 1992;30:2462-5.
 26. Talkinynon D.F., Thacker W., Keller D.W., et al. Diagnosis of *M. pneumoniae* infection in autopsy and open-lung biopsy tissues by Nested PCR. J Clin Microbiol 1992;36:1151-3.
 27. Tartakovskii I.S., Sinopalnikov A.I., Martinova V.R., Gorina L.G. Community-acquired pneumonia: etiologic diagnosis and strategy of antibiotic therapy. In: B.P. Berdal ed. Legionella infection and atypical pneumonias. Oslo, Norway; 1996. p.149-52.
 28. Verkojven R.P., Willemse D., Hiep-van Casteren S.C.A.M., et al. Evaluation of PCR, culture and serology for diagnosis of *C. pneumoniae* respiratory infection. J Clin Microbiol 1998;36:2301-7.
 29. Waris M.E., Toikka P., Saarinen T., et al. Diagnosis of *M. pneumoniae* in children. J Clin Microbiol 1998; 36:3155-9.
 30. Zhang G.Q., Hotta A., Mizutani M., et al. Direct identification of *Coxiella burnetii* plasmids in Human serum by nested PCR. J Clin Microbiol 1998;36:2210-3.