

Respiracinės infekcijos sukėlėjų mikrobiologinių tyrimų diagnostinė vertė

DIAGNOSTIC VALUE OF MICROBIOLOGICAL TEST DETERMINING THE RESPIRATORY AGENTS

ASTRA VITKAUSKIENĖ
LSMU MA Laboratorinės medicinos klinika

Santrauka. Apatinių kvėpavimo takų infekcijos (AKT), įskaitant ūminį ir lėtinį bronchitą, visuomenėje įgyta pneumonija (VIP), ligoninėje įgyta pneumonija (kitaip dar vadinama hospitaline pneumonija, HP) arba pneumonija imunosupresiniams bei kitomis lėtinėmis ligomis sergantiems pacientams yra dažniausios infekcijos tiek visuomenėje, tiek stacionare. Ligų prevencijos ir kontrolės centro (angl. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) duomenimis, AKT infekcijos sukelia nuo 5 iki 10 proc. visų pacientų mirčių. Lyginant kelis dešimtmečius, pacientų populiacija sparčiai kinta. Daugėja vyresnio amžiaus, vyresnių nei 65 metų, slaugos ligoninėse besigydančių, imunosupresinių pacientų, todėl AKT etiologija ir potencialių sukėlėjų spektras taip pat kinta. Klinikinė mikrobiologinė laboratorija atlieka svarbų vaidmenį nustatant šių infekcijų sukėlėjus, tačiau susiduria su daugybe iššūkių, susijusių su AKT infekcijų tyrimo sudėtingumu. Tai mėginių kokybė ir įvairovė, tiriamosios medžiagos užteršimas orofaringine flora, įvairių galimų patogenų populiacija, įskaitant bakterijas, virusus ir grybus, kompleksinė kvėpavimo takų infekcijų patofiziologija, ypač specialiose sergančiųjų populiacijose. Dažniausi klausimai ir problemos, kurias tenka spręsti: 1. Kokia yra tikroji skreplių, dažytų Gramo būdu, mikroskopijos ir pasėlio vertė? 2. Kokia yra pusiau kiekybinių mikrobiologinių bronchų išplovų ir kiekybinių bronchoalveolinio lavažo pasėlių reikšmė? 3. Koks yra klinikinės mikrobiologijos laboratorijos vaidmuo diagnozuojant lėtinio bronchito paūmėjimą? 4. Kaip reikia optimizuoti cistine fibroze (CF) sergančių pacientų, ypač ligai paūmėjus, mikrobiologinį vertinimą?

Reikšminiai žodžiai: apatinių kvėpavimo takų infekcija, mikrobiologinė diagnostika.

Summary. Lower respiratory tract infections (LRTI), including acute and chronic bronchitis, community-acquired pneumonia, hospital-acquired pneumonia, and pneumonia in immunocompromised hosts or pneumonia in patients with other health problems, are the most common respiratory infectious illnesses. According to *Centers for Disease Control and Prevention*, lower respiratory tract infections are responsible for 5–10% all-cause mortality. Changes in the characteristics of the population, such as the number of individuals over age 65, the number of individuals in nursing homes, and the number of patients with immunocompromising conditions, have increased the number of individuals at risk, the number of infections that occur and the variety of pathogens known to cause infection. The role of the microbiology laboratory in the diagnosis of milder cases of acute bronchitis and community-acquired pneumonia has been challenged. Even for seriously ill patients controversy exists over the diagnostic value of many specimens obtained routinely, as well as those that are obtained via more invasive procedures such as bronchoscopy. The clinical laboratory plays a vital role in the diagnosis of these infections but faces numerous challenges due to the complexity of LRTIs, including specimen quality and diversity; contamination of specimens with oropharyngeal flora; a diverse pathogen population that includes bacteria, viruses, and fungi; and the complex pathophysiology of respiratory tract infections, especially in special populations. Five current questions in the clinical microbiology of LRTI were discussed: 1. What is the real value of the Gram stain of expectorated sputum? 2. What is the value of quantitative culture techniques on bronchoalveolar lavage (BAL) and mini-BAL specimens, endotracheal (ET) aspirates, and transbronchial biopsy specimens? 3. What is the role of the clinical microbiology lab in the diagnosis of acute exacerbations of chronic bronchitis (AECB)? 4. How do we optimize the microbiological evaluation of cystic fibrosis (CF) patients with exacerbations?

Keywords: Lower respiratory tract infections, diagnostic microbiology.

IVADAS

Mikrobiologiniai tyrimai atlieka svarbų vaidmenį tiriant infekcines kvėpavimo takų ligas, kurias gali sukelti virusai, bakterijos, grybai arba parazitai. Gali būti atliekamas skreplių tyrimas arba tiriamoji medžiaga paimama taikant invazines technologijas. Standartiniai mikroskopijos ir mikrobiologinio pasėlio metodai dažnai papildomi serologiniais tyrimais, nustatant specifinius antikūnus, bei molekulinės biologijos metodais (polimerazės grandininė reakcija, PGR), siekiant nustatyti mikroorganizmo deoksiri-

bonukleorūgštį (DNR) arba ribonukleorūgštį (RNR). Kiekvienas tyrimo metodas, priklausomai nuo mėginio tipo arba ligos trukmės, turi savo privalumų ir trūkumų (1–3 lentelės). Labai svarbu tinkamai nustatyti ir įvertinti jautrumą priešmikrobinėms medžiagoms.

MIKROBIOLOGINĖS DIAGNOSTIKOS GALIMYBĖS SIEKIANT NUSTATYTI APATINIŲ KVĖPAVIMO TAKŲ INFEKCIJOS SUKĖLĖJĄ

Bakterijos atlieka svarbų vaidmenį apatinių kvėpavimo takų (AKT) infekcijų patogenezėje ir gali sukelti

Pulmonologija ir alergologija

1 lentelė. Galimi dažniausių sunkios eigos visuomenėje įgytos pneumonijos bakterijų diagnostikos metodai

Sukėlėjas	Diagnostikos metodas			
	Apatinių kvėpavimo takų sekreto pasėlis	Antigeno nustatymas	Kraujo pasėlis	PGR
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Esant geros kokybės skrepliams ir nevarojant antibiotikų, bakterijos gali būti aptinkamos 60–80 proc. atvejų.	Rezultatas gaunamas per trumpesnį nei 30 min. laikotarpį. Imunochromatografinio metodo jautrumas – 60–85 proc., specifiškumas – 99 proc. Serotipo specifinio antigeno šlapime nustatymo metodo jautrumas – 98 proc., specifiškumas – 99 proc.	Teigiamas mažiau kaip 10 proc. atvejų, rezultatai gaunami per 1–2 dienas	Rezultatas gaunamas per kelias val. Pasižymi dideliu jautrumu ir specifiškumu. Galimybė anksti aptikti netgi mažą bakterijų kiekį, mažesnė antibiotiko įtaka aptikimui, lyginant su pasėlio metodu. Trūkumai: techniniai reikalavimai laboratorijai, aukšta tyrimo kaina, nėra standartizacijos.
<i>Legionella pneumophila</i>	Jautrumas – 50–80 proc., labai didelis specifiškumas (auksinis standartas). Leidžia aptikti skirtingus tipus. Trūkumai: reikalingos specialios terpės, auginimo sąlygos, didelė antibiotikų įtaka, vėlyva diagnostika.	Rezultatas gaunamas per trumpesnį nei 30 min. laikotarpį. Esant 1 serogrupei, jautrumas – 75–80 proc., specifiškumas – 99–100 proc. Trūkumai: gali būti teigiamas po buvusios infekcijos. Per pirmas 5 dienas gali būti gaunamas klaidingai neigiamas atsakymas.		Rezultatas gaunamas per kelias val. Didelis tyrimo jautrumas ir specifiškumas. Galima anksti aptikti mažą bakterijų kiekį, mažesnė antibiotiko įtaka aptikimui, lyginant su pasėlio metodu. Trūkumai: techniniai reikalavimai laboratorijai, aukšta tyrimo kaina, nėra standartizacijos. Gali būti sunku paimti kvėpavimo takų mėginį.

Santrumpa: PGR – polimerazės grandininė reakcija.

2 lentelė. Galimi virusų diagnostikos metodai

Sukėlėjas	Diagnostikos metodas			
	Greitas testas antigenui nustatyti	Imunofluorescentinis antikūnų tyrimas	Viruso ląstelių kultūros	Tikrojo laiko PGR
<i>Influenza virusas</i>	Rezultatas pateikiamas per trumpesnį nei 30 min. laikotarpį. Viršutinių kvėpavimo takų mėginiai. Jautrumas – 40–70 proc., specifiškumas – 90–95 proc. Trūkumas: negalima nustatyti viruso subtipų.	Rezultatas gaunamas per kelias valandas. Galima tirti viršutinių ir apatinių kvėpavimo takų mėginius. Vienu metu galima aptikti gripo ir kitus respiracinius virusus. Jautrumas – 50–85 proc., specifiškumas – 90–95 proc. Trūkumai: svarbu, kad mėginys būtų su epitelinėmis ląstelėmis, darbuotojų patirties trūkumas, negalima nustatyti viruso subtipų.	Jautrumas – 7–20 proc., aukštas specifiškumas. Galima nustatyti viruso subtipus, kiekį, jautrumą priešvirusiniams vaistams. Trūkumai: reikalingos ląstelių linijos, specifinės sąlygos, vėlyva diagnostika (3–10 dienų).	Rezultatai pateikiami per kelias valandas. Didelis jautrumas ir specifiškumas (auksinis standartas). Tinka įvairiems mėginiams. Galima nustatyti subtipą ir genotipinį atsparumą. Kartu galima nustatyti ir kitus virusus. Trūkumai: speciali laboratorija, aukšta kaina.

Santrumpa: PGR – polimerazės grandininė reakcija.

3 lentelė. Galimi atipinės eigos visuomenėje įgytos pneumonijos sukėlėjų diagnostikos metodai

Sukėlėjas	Diagnostikos metodas	
	Serologinė diagnostika	Molekulinė diagnostika
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ELISA (imunofermentinis), komplemento fiksacijos, agliutinacijos metodai. Porinių serumų tyrimas ir titro padidėjimas keturis kartus (tiriant po 2–4 savaičių) rodo ūminę infekciją. Vienkartinis specifinio IgM padidėjimas rodo neseną infekciją. Tyrimo jautrumas – 20–60 proc., specifiškumas – 70–90 proc. Trūkumai: retrospektyvi diagnostika, klaidingai teigiamas rezultatas, jeigu infekcija buvo 8 mėn. laikotarpio.	Rezultatai pateikiami per kelias valandas. Didelis jautrumas, vidutinis arba aukštas specifiškumas. Trūkumai: techniniai reikalavimai laboratorijai, aukšta tyrimo kaina, nėra standartizacijos, negalima atskirti ūminės infekcijos nuo besimptomio nešiojimo, ypač vaikams.

letalias baigtis pacientams, sergantiems pneumonija, ypač esant sunkioms gretutinėms patologijoms. Nors tikėtini bakteriniai sukėlėjai, galintys sukelti sunkios eigos visuomenėje įgytą pneumoniją (VIP) ir lemti blogas baigtis, dažnai yra numanomi (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumoniae*), tačiau infekcinio proceso eiga priklauso ne tik nuo sukėlėjo patogeniškumo veiksnių arba skiriamo antibakterinio vaisto, tačiau šiame procese svarbų vaidmenį atlieka ir paties paciento gynybinės apsauginės funkcijos. Todėl netgi skiriant tinkamą antibakterinį gydymą, veikiančią bakterinį sukėlėją, ligos eiga pacientui gali būti nepalanki. Progresuojant infekciniam procesui ir neturint mikrobiologiškai išskirto/patvirtinto konkretaus sukėlėjo pagrindimo, kodėl buvo pasirinkta vienokia arba kitokia gydymo taktika ir skirtas tam tikras antibiotikas, visada išlieka rizika, kad konkrečiu atveju nebuvo apsvaistytas kitas – retesnis arba atsparesnis antibiotikams sukėlėjas. Mikrobiologinė diagnostika ir nustatytas aiškus patogenas įgalina skirti įmanomai siauriausio veikimo antibakterinį gydymą, gydyti mažiausiomis sąnaudomis, tiek pacientui, tiek gydančiam gydytojui jaustis saugiam. Mikrobiologinis skreplių pasėlio tyrimas rekomenduojamas sergantiesiems lėtinėmis ligomis, kartojantis kvėpavimo takų infekcijoms, taip pat pacientams, kuriems reikia stacionarinio gydymo.

Siekiant nustatyti sunkios eigos VIP etiologiją, rekomenduojama paimti skreplių mikrobiologinį pasėlį, kraujo pasėlį (karščiavimo metu) bei nustatyti *S. pneumoniae* ir *L. pneumophila* antigeną šlapime. Kraujo pasėliai, paimti prieš paskiriant antibiotiką, pasižymi labai dideliu specifiškumu, tačiau yra mažai jautrūs, bakterijų augimas nustatomas rečiau kaip 20 proc. atvejų. Esant sunkios eigos liginėje įgytai pneumonijai (hospitalinei pneumonijai, HP), tikimybė išauginti sukėlėją yra žymiai didesnė, nes tokie antibiotikams atsparūs sukėlėjai, kaip *Pseudomonas aeruginosa* ar *Acinetobacter baumannii* išauginami ir empirinio antibakterinio gydymo fone.

Siekiant nustatyti respiracinės infekcijos sukėlėją, o ne viršutinių kvėpavimo takų (VKT) kolonizantą, svarbu mikrobiologinį pasėlį iš AKT paimti tinkamai, laiku pristatyti tyrimui į laboratoriją ir profesionaliai įvertinti. Viršutiniai VKT gali būti kolonizuoti tais pačiais potencialiais VIP sukėlėjais, kurie, patekę į AKT, sukelia infekciją (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus*). Todėl netinkamai paimtas AKT mėginys ir išskirtas potencialus lėtinės obstrukcinės plaučių ligos (LOPL) arba VIP sukėlėjas gali ne padėti, bet suklaidinti, ypač jeigu antibakterinis gydymas yra nukreiptas į kolonizuojantį mikroorganizmą, o ne į tikrąjį sukėlėją, kurio identifikuoti nepavyko dėl netinkamo tiriamosios medžiagos paėmimo arba tyrimo. Gramo būdu dažyto tepinėlio mikroskopinis tyrimas

ir mikrobiologinis pasėlis yra ribotos vertės, nes daugiau kaip 25 proc. pacientų, sergančių LOPL, VKT yra kolonizuoti bakteriniais patogenais, ypač tikėtinas *S. pneumoniae* ar *H. influenzae*. Todėl labai svarbu prieš atliekant skreplių mikrobiologinį pasėlį įvertinti jų kokybę – atliekant Gramo būdu dažyto tepinėlio mikroskopinį tyrimą, įvertinamas plokščiojo epitelio, polimorfonuklearų ir vyraujančių bakterijų buvimas. Jeigu plokščiojo epitelio ląstelių randama daugiau kaip 10 regėjimo lauke, o polimorfonuklearų mažiau kaip 25 regėjimo lauke, tokie skrepliai turėtų būti vertinami kaip VKT sekretas (seilės) ir mikrobiologinis tyrimas toliau neatliekamas. Gramo būdu dažyto tepinėlio mikroskopinio tyrimo jautrumas, sergant pneumokoko sukelta VIP, siekia 80 proc., stafilokokinės VIP atveju – 78 proc., specifiškumas – net 93–96 proc.

Vienas daugiausia diskusijų keliančių sukėlėjų – *Moraxella catarrhalis*, kuris laikomas nosiaryklės kolonizantu, ypač vaikams šaltuoju metų laikotarpiu. Suaugusiesiems, turintiems rizikos veiksnių, tokių kaip LOPL, gali būti kliniškai reikšmingas paūmėjimo metu. Pastarojoje situacijoje vertinti mikrobiologinį pasėlį sudėtinga, nes tiriamojoje medžiagoje neabejotinai bus ir VKT sekreto, todėl *M. catarrhalis* galima aptikti beveik kiekviename mėginyje. Todėl, tiriant netgi geros kokybės skreplius, šio sukėlėjo kaip galimo patogeno įvertinimui reikalingi papildomi kriterijai: skrepliai turi būti pūlingi, mikroskopinio tyrimo metu matomi dominuojantys gramneigiami diplokokai ir mikrobiologiniame pasėlyje nėra kito potencialaus AKT infekcijos sukėlėjo. Negalima pamiršti, kad skreplių pasėlio rezultatuose, išskyrus netgi didelį kiekį *M. catarrhalis*, abejonių dėl šio mikroorganizmo klinikinės vertės visada išliks. Todėl patikimiau, ypač esant sunkios eigos kvėpavimo takų infekcijai, tiriamąją medžiagą etiologijai verifikuoti paimti bronchoskopo pagalba, įvertinti kiekybiškai ir tik išaugus diagnostiniam *M. catarrhalis* kiekiui ($>10^5$ KSV/ml), ją galima traktuoti kaip galimą patogeną.

Pleuros skysčio mikrobiologinis pasėlis yra labai specifiškas, tačiau mažesnio jautrumo. Pleuritas nustatomas tik apie 40 proc. VIP pacientų, neretai punktuojamas jau vartojamų antibiotikų fone, todėl sukėlėjo išauginimo tikimybė mažėja.

Siekiant greitesnės diagnostikos, populiarėja molekulinės diagnostikos metodai: specifinių bakterijų arba virusų nustatymas PGR metodu. Šiam tyrimui įtakos neturi trumpalaikis – 2–3 dienų antibakterinis gydymas, nes nustatomi ir negyvybingi bei žuvę mikroorganizmai, tačiau, tiriant kvėpavimo takų sekretą, atsiranda ir tikimybė nustatyti kliniškai nereikšmingą sukėlėją-kolonizantą. Todėl rekomenduojamas PGR metodas, galintis ne tik aptikti, tačiau nustatyti ir pneumokokų kiekį, t. y. galintis aptikti 10^4 – 10^5 kopijų/ml. Tyrimai rodo, kad skreplių PGR yra labiau jautrus

Pulmonologija ir alergologija

metodas nei skreplių pasėlis *S. pneumoniae* nustatyti pacientams, stacionarizuotiems dėl VIP, ypač tiems, kurie jau gydomi antibiotikais. Tačiau metodas nėra validuotas klinikiniams mėginiams ir naudojamas tik moksliniais tikslais. Atlikta tyrimų, kuriuose teigiama, kad galima prognozuoti VIP ligos eigą pacientams, priklausomai nuo kraujyje rastų *S. pneumoniae* kopijų/ml skaičiaus – esant didelei bakteriemijai, didesnė tikimybė išsivystyti sepsiniam šokui. Taip pat molekuliniais metodais galima nustatyti ne tik patį sukėlėją, tačiau ir jo serotipą, o tai gali būti svarbu vertinant skiepų veiksmingumą.

Mikrobiologinių tyrimų diagnostinę vertę geriausiai rodo lėtinėmis ligomis sergančių pacientų tyrimas. Neabejotina, kad cistine fibroze sergantiems pacientams antibakterinio gydymo pagrindas pagrįstas mikrobiologinių tyrimų rezultatais. Paūmėjusiai infekcijai gydyti antibiotikų skiriama remiantis paūmėjimo metu atlikto arba paskutinio mikrobiologinio tyrimo rezultatais. Gydymo eigoje pacientų sukėlėjų spektras kinta, taigi, galima tikėtis retesnių patogenų, tokių kaip *Stenotrophomonas maltophilia* (anksčiau vadinta *Pseudomonas maltophilia*, *Xantomonas maltophilia*), *Achromobacter xylosoxidans*, *Pandoraea spp.* (įskaitant *Pandoraea apista*). Labai svarbu nustatyti, ar pacientas yra kolonizuotas tuo pačiu, ankstesnio paūmėjimo metu išskirtu sukėlėju, ar yra naujas potencialus patogenas. Todėl laboratorijoje bakterijų identifikacija masių spektrometrijos būdu, analizuojant mikroorganizmų vidinius baltymus ir lyginant juos su biotipavimo etalonų bibliotekoje saugomais mikroorganizmų įrašais, yra patikimos diagnostikos garantas.

HP sukėlėjų spektras gali skirtis priklausomai nuo pacientų, gydomų Intensyviosios terapijos skyriuose

(ITS) populiacijos, stacionarinio gydymo trukmės bei naudojamų specifinių diagnostinių procedūrų. Europos infekcijų paplitimo ITS tyrimai skelbia, kad HP gali sukelti ir gramteigiami, ir gramneigiami sukėlėjai, tačiau svarbu tai, jog nustatyta, kad net 60 proc. šių sukėlėjų yra atsparūs dažniausiai vartojamiems antibiotikams. Bronchoalveolinio lavažo mikrobiologinis tyrimas išlieka ypač informatyviu tyrimu, siekiant išvengti VKT kolonizuojančios floros ir nustatyti tikrąjį etiologinį sukėlėją HP sergantiems asmenims.

APIBENDRINIMAS

Mikrobiologinės diagnostikos galimybės plačios. Sergantiesiems apatinių kvėpavimo takų infekcija, siekiant nustatyti sukėlėją, galima atlikti keletą tyrimų. Tačiau, siekiant patikimos mikrobiologinės diagnostikos bei tikslaus diagnostikos metodo parinkimo, svarbus gydytojų specialistų ir laboratorijos gydytojų bendradarbiavimas.

LITERATŪRA

1. **Campbell Sh, Forbes BA.** The Clinical Microbiology Laboratory in the Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):30–3.
2. **Reimer LG, Carroll KC.** Role of the Microbiology Laboratory in the Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections. *Clin Infect Dis.* 1998;26(3):742–8.
3. **Torres A, Lee N, Cilloniz C, Vila J, Van der Eerden M.** Laboratory diagnosis of pneumonia in the molecular age. *Eur Respir J.* 2016;48(6):1764–78.
4. **Xirogianni A, Tsofia M, Voyiatzi A, Sioumala M, Makri A, Argyropoulou A et al.** Diagnosis of Upper and Lower Respiratory Tract Bacterial Infections with the Use of Multiplex PCR Assays. *Diagnostics.* 2013;3(2):222–31.
5. **Bartlett JG.** Diagnostic approach to community-acquired pneumonia in adults. UpToDate. 2018. Internetinė prieiga: <https://www.uptodate.com/contents/diagnostic-approach-to-community-acquired-pneumonia-in-adults> (žiūrėta 2018 08 21).