

8.Микробиологична диагностика на инфекции на долните дихателни пътища

8.1. Видове инфекции на долните дихателни пътища:

Инфекциите на дихателните пътища са сред най-често срещаните инфекциозни заболявания. Списъкът на причинителите продължава да се разширява с признаването на нови патогени и синдроми. Този раздел описва основните етиологични агенти и микробиологичните подходи за диагностициране на:

- Бронхит и бронхиолит;
- Пневмония, придобита в обществото (ППО);
- Вътреболнична пневмония (ВБП);
- Вентилация-асоциирана пневмония (ВАП);
- Инфекции на плевралното пространство;
- Бронхопулмонални инфекции при пациенти с муковисцидоза;
- Пневмонии при имунокомпрометирани пациенти.

8.2. Ключови моменти в микробиологичната диагностика на инфекциите на долни дихателни пътища:

- Реакциите за амплификация на нуклеинови киселини (напр. PCR) до голяма степен замениха бързите антигенни тестове и културелните изследвания за детекция на респираторни вируси;
- Клиницистите следва да осъществяват връзка с микробиологичната лаборатория за специфични инструкции преди вземането на материал за изследване за възбудители на патогени, напр. *Bordetella pertussis*;
- За бактериално културелно изследване е най-добре да се използва първа сутрешна храчка, взета след експекторация;
- Хемокултури, придружаващи пробите от храчки, понякога могат да бъдат полезни, особено при високорискови пациенти с ППО;
- Наборът от патогени, причиняващи екзацербация на белодробното заболяване при пациенти с муковисцидоза, се е разширил и при някои пациенти е добре да се вземат материали и за микобактерии и гъбички;
- Бронхоалвеоларният лаваж е най-подходящият материал за микробиологично изследване и диагностика в педиатрията.

8.3. Микробиологични подходи в диагностиката на бронхит и бронхиолит

В Таблица 18 са изброени етиологичните агенти и диагностичните подходи при бронхиолит, остър бронхит, екзацербация на хроничен бронхит, коклюш и клинични синдроми, включващи възпаления на трахеобронхиалното дърво (Ralston SL,2014; Hasegawa K,2014). Бронхиолитът е най-честата инфекция на долните дихателни пътища при деца (Ralston SL,2014; Hasegawa K,2014). Вирусите, самостоятелно или в комбинация, са основните причини за синдрома, характеризиращ се с бронхоспазъм,

хриптене, резултат на остро възпаление, оток на дихателните пътища и повишена продукция на мукус. Острият бронхит се дължи главно на вирусни патогени и по-рядко се причинява от *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae*. Коклюшът, причинен от *Bordetella pertussis*, трябва да се подозира при юноши или млади пациенти с пароксизмална кашлица. Реакциите за амплификация на нуклеинови киселини в комбинация с културелни изследвания са препоръчителните тестове на избор за детекция на *B. pertussis*. Понастоящем съществуват няколко одобрени от Агенцията за контрол на храните и лекарствата в САЩ (FDA) начина за изолиране на *B. pertussis*. Центровете за контрол и превенция на заболяванията (CDC) са предложили най-добри практики, при използване на молекулярни тестове за детекция на коклюш.

(<https://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/diagnosis-pcr-bestpractices.html>).

Таблица 18. Насоки за микробиологична диагностика на бронхит, бронхиолит и коклюш (Miller J et al, 2018).

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Транспортни особености и оптимално транспортно време
1. При бронхиолит			
Вируси ^a			
<i>RSV</i> <i>Rhinovirus</i> <i>Adenovirus</i> <i>Coronavirus</i> <i>HMPV</i>	-Реакции за амплификация на НК.	Назален аспират или смив, назофарингеални секрети или аспирати, гърлен секрет или смив.	В транспортни среди за вируси или стерилен контейнер, на стайна температура до 2ч. или при 2-8°C до 24-48 ч.
<i>Enterovirus</i> <i>PIV</i> <i>Influenza virus</i> <i>Human bocavirus type 1</i>	-Бързи антигенни тестове ^b -Вирусологично култивиране ^c -PCR	Назофарингеален секрет или аспират, назален смив Назофарингеален секрет, назофарингеален аспират, назален смив, гърлен секрет или смив	В транспортни среди за вируси или стерилен контейнер, на стайна температура до 2ч. или при 2-8°C до 24-48 ч.
2. При остър бронхит			
Бактерии			
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-Реакции за амплификация на НК ^d -Серология: специфични IgM и IgG антитела в серум	Гърлен секрет, Назофарингеален секрет, Назофарингеален аспират. - 5ml Серум	Стерилен контейнер с транспортна среда, на стайна температура до 2 ч. Моновета, на стайна температура до 2 ч.
<i>Chlamydothyla pneumoniae</i>	-Реакции за амплификация на НК ^d - Серология: специфични IgM и IgG антитела в серум	Назофарингелен секрет -5ml Серум	Стерилен контейнер с транспортна среда, на стайна температура до 2 ч. Моновета, на стайна температура до 2 ч.

Таблица 18. (продължение)

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Транспортни особености и оптимално транспортно време
Вируси			
<i>Influenza virus</i> <i>PIV</i> <i>RSV</i> <i>HMPV</i> <i>Coronavirus</i> <i>Adenovirus</i> <i>Rhinovirus</i>	-Реакции за амплификация на НК -Бързи антигенни тестове ^b -Вирусологично култивиране ^c	Назален аспират или смив, назофарингеални секрети или аспирати, гърлен секрет или смив.	В транспортни среди за вируси(ВТС) или стерилен контейнер , на стайна температура до 2ч. или при 2-8°C до 24-48 ч.
3.При обострен хроничен бронхит			
Бактерии			
<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i>	Оцветяване по Грам Аеробно култивиране PCR	Експекторирана храчка	В стерилен контейнер, на стайна температура до 2ч. или при 2-8°C до 24ч.
<i>Chlamydomphyla pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-Като при остър бронхит -Като при остър бронхит	-Вж. Chlamydomphyla и Mycoplasma по-горе -Вж. Chlamydomphyla и Mycoplasma по-горе	-Вж. по-горе -Вж. по-горе
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-Оцветяване по Грам Аеробно култивиране; PCR антиген в урина ^c	Първа сутрешна средна порция урина	В стерилен контейнер, стайна температура до 2ч.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Оцветяване по Грам Аеробно култивиране	Експекторирана храчка	В стерилен контейнер, на стайна температура -до 2ч. или при 2-8°C до 2-24ч.
Вируси			
<i>Rhinovirus</i> <i>Coronavirus</i> <i>PIV (най-често PIV3)</i> <i>Influenza virus</i> <i>RSV</i> <i>HMPV</i> <i>Adenoviruses</i>	-Бързи антигенни тестове ^b -Вирусологично култивиране ^c -Реакции за амплификация на НК .	Назален аспират или смив , назофарингеални секрети или аспирати, гърлен секрет или смив.	ВТС или стерилен контейнер , на стайна температура до 2ч. или при 2-8°C до 24-48 ч.
4.При коклюш			
<i>Bordetella pertussis</i>	Култивиране на селективен Борде-Жангу агар ; Реакции за амплификация на НК ^c	Назофарингеален секрет; Назофарингеален аспират; Назален смив.	Материал за култивирането –в подходяща транспортна среда, на СТ до 24ч. ^f -Материалите за амплификация на НК се вземат с тампон с накрайник от полиестер, коприна, найлон ^g

Съкращения: HMPV, човешки метапневмовирус; IgG - имуноглобулин G; IgM - имуноглобулин M; PIV - параинфлуенца вирус; RSV - респираторен синцитиален вирус; СТ - стайна температура; ВТС - вирусна транспортна среда.

^a Вирусите са изброени в низходящ ред на честотата за доказването им (Hasegawa K,2014)

^b Бързите антигенни тестове за откриване на респираторни вируси нямат висока чувствителност, а специфичността им варира според производителя. Скорошен мета-анализ на бърз антигенен тест за грипния вирус показва обща чувствителност от 62,3% и обща специфичност от 98,2% (Chartrand C,2012). Те трябва да се разглеждат само като скринингови тестове. Отрицателният резултат трябва да се провери с друг метод. Качеството на взетия биологичен материал е от решаващо значение за оптимизиране на тези тестове.

^c Видът на клиничния материал зависи от търсения вирус. Най-общо - гърлените секрети са най-малко предпочитани. Трябва да се внимава за запазване на клетките при използване на транспортни среди за вируси или транспортирането на материалите в стерилен контейнер върху лед (не сух) да става възможно най-бързо след взимането на материала.

^d Клиницистите трябва да се консултират с Микробиологичната лаборатория за валидиране на местата, от които се събира клиничен материал, вземането и транспортирането и времето за изпълнение. По принцип е редно да се избягват тампони с калциев алгинат и тампони с мини накрайници за тестовете за амплификация на нуклеинови киселини

^e Чувствителността при небактериемични пациенти с пневмококова пневмония е 52% -78%; чувствителността при бактериемични случаи на пневмококова пневмония е 80% -86%; специфичността при възрастни е > 90%. Въпреки това, проучванията съобщават за 21% -54% фалшиво-положителни резултати при деца с назофарингеално носителство и без данни за пневмония, както и при възрастни с хронична обструктивна белодробна болест (Carroll KC,2016; Sinclair A ,2013).

^f Тампоните с памучен или калциев алгинат не са подходящи, тъй като съдържат вещества, които инхибират полимеразната верижна реакция (PCR).

^g Посявката на материалите до леглото на болния е най-добрият вариант, но се извършва рядко. Подходящи са няколко вида транспортни среди. Те включват транспортните среди на Amies и Regan-Lowe (Hardy Diagnostics) (Bordetella cultures 3.11.6. In: Clinical microbiology procedures handbook,2016).

Streptococcus pneumoniae и *Haemophilus influenzae* нямат установена етиологична роля при острия бронхит, но те, заедно с *Moraxella catarrhalis*, играят важна роля в случаите на обостряне на хроничния бронхит. Реакциите за амплификация на нуклеинови киселини за детекцията на широк диапазон от респираторни вируси и някои от „атипичните бактерии”, свързани с респираторни синдроми, са заменили бързите антигенни тестове и културелното изследване в някои лаборатории. Местата, от които се взема биологичен материал, могат да варират в зависимост от вида на анализа. Респираторният синцитиален вирус, човешкият риновирус, човешкият метапневмовирус, човешкият коронавирус и параинфлуенца вирусът от тип 3 са значими причинители на бронхиолит при кърмачета и малки деца (Mansbach JM,2012). Коинфекциите не са редки и се наблюдават в до 30% от случаите.

8.4. Микробиологични подходи в диагностиката на пневмония, придобита в обществото(ППО)

Диагнозата на ППО се основава на наличието на специфични симптоми и подкрепящи образни данни, като наличие на белодробни инфилтрати и/или плеврален излив. Внимателно извършените микробиологични резултати могат да подкрепят диагнозата, но често не се открива етиологичен агент. В Таблица 19 са изброени по-честите причинители на ППО. Но трябва да се имат предвид и други, по-рядко срещани патогени, при анамнеза за скорошно пътуване или контакт с вектори или животни, които предават зоонозни патогени като вируса на *Sin Nombre* (причинител на

хантавирусен белодробен синдром) или *Yersinia pestis* (причинител на белодробна чума).

Таблица 19. Микробиологична диагностика на пневмонии, придобити в обществото (Miller J et al, 2018)

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Особености при транспортиране и оптимално транспортно време
1. Бактерии			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Микроскопия на препарати по Грам и с метиленово синьо Култивиране	Храчка, материали от бронхоскопия	Стерилен контейнер, СТ, 2 ч; Или при 4°C 2–24 ч.
	Антиген в урина ^a	Урина	Стерилен контейнер, СТ, 24 ч; Или при 2°C–8°C за 24ч до 14 дни.
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Микроскопски препарати по Грам и с мет. синьо Култивиране	Храчка, материали от бронхоскопия	Стерилен контейнер, СТ, 2 ч; Или при 4°C за 2-24ч.
<i>Legionella</i> spp	Антиген в урина <i>L. pneumophila</i> серогрупа 1	Урина	Стерилен контейнер, СТ, 24 ч; Или при 2°C–8°C за 24 ч-14 дни
	Посявка на селективен <i>Legionella</i> агар.	Индуцирана храчка, материали от бронхоскопия	Стерилен контейнер, СТ, 2 ч; или при 4°C за 2–24ч.
	Реакции за амплификация на НК ^b	Индуцирана храчка, материали от бронхоскопия	Стерилен контейнер, СТ, 2 ч; или при 4°C за 2–24ч.
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Реакции за амплификация на НК ^b	Гърлен секрет, назофарингеален секрет, храчка, БАЛ.	Транспортиране в М4 среда или други <i>Mycoplasma</i> -специфични среди при СТ или 4°C до 48 ч; или ≥48 ч при –70°C
	Серология: специфични IgM и IgG антитела	Серум	Моновета, на СТ до 24 ч; При 4°C за >24 ч.
<i>Chlamydothyla pneumoniae</i>	Реакции за амплификация на НК ^b	Назофарингеален секрет, гърлен смив, храчка, бронхиален секрет	Транспортиране в М4 среда или други <i>Chlamydia</i> -специфични среди при СТ или 4°C до 48 ч; или ≥48 ч при –70°C
	Серология: (MIF) IgM титър; IgG в двойка серумни проби през 2-3 седм.	Серум	Моновета, на СТ до 24 ч; При 4°C за >24 ч.
Анаеробни бактерии (аспирационна пневмония)	Микроскопски препарати по Грам и с метиленово синьо. Аеробно и анаеробно култивиране	Проба от бронхоскопска протектирана четкова биопсия.	Стерилна тубичка с 1 mL физ.р-р или тиогликолат; СТ, 2 ч; >2–24 ч
		Плеврална течност (ако е налична такава)	Стерилен контейнер, СТ, без транспортна среда ≤60 мин; Анаеробна транспортна среда, СТ, 72 ч

Таблица 19. (продължение)

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Особености при транспортиране и оптимално транспортно време
Микобактерии			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> и <i>HTM</i>	Препарат за киселинно устойчиви бактерии(КУБ) Култивиране на КУБ Реакции за амплификация на НК ^{c,d}	Спонтанно-отделена храчка; индуцирана храчка; бронхоскопски взети материали стомашни аспирати в педиатрията.	Стерилен контейнер, СТ, ≤2 ч; При 4°C за ≤24 ч,
2.Гъбички			
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Микроскопия на препарати с оцветяване за гъбички; Култивиране за гъбички	Спонтанно-отделена храчка; индуцирана храчка; бронхоскопски взети материали; Тъкан	Стерилен контейнер, СТ, <2 ч; При 4°C за ≤24
	Хистология	Тъкан	Стерилен контейнер, 4°C; контейнер с формалин, СТ, 2–14 дни
	Антигенни тестове	Серум, БАЛ, урина, плеврална течност(ако е налична)	Моновета, СТ, 2 дни; При 4°C за 2–14 дни, Стерилен контейнер (урина), СТ, 2 h; При 4°C , до 2–72 ч,
	Серумни антитела (реакция за свързване на комплемента)	Серум	Моновета, СТ, до 24 ч; При 4°C, >24 ч
<i>Coccidioides immitis/posadasii</i>	Препарат, оцветен за гъбички; културелно изследване;	Спонтанно-отделена храчка; индуцирана храчка; бронхоскопски взети материали	Стерилен контейнер, СТ, <2 ч; При 4°C за ≤24
	Хистология	Тъкан	контейнер с формалин, на СТ, 2–14 дни; Стерилен контейнер, 2–14 дни, 4°C
	Серумни антитела IgM (ID, LA, EIA) IgG антитела(реакция за свързване на комплемента, EIA)	Серум	Моновета, СТ , 24 h; При 4°C >24 ч,

Таблица 19. (продължение)

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Особености при транспортиране и оптимално транспортно време
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Препарат, оцветен за гъбички; културелно изследване;	Спонтанно-отделена храчка; индуцирана храчка; бронхоскопски взети материали; тъкан	Стерилен контейнер, СТ, <2 ч; при 4°C за ≤24 ч
	Хистология	Тъкан	Стерилен контейнер, 4°C, Контейнер с формалин СТ, 2–14 дни.
	Антигенни тестове	Серум	Моновета, СТ, 24 ч.
		Урина, БАЛ, плеврална течност(ако е налична)	Стерилен контейнер, 4°C, 2–14 дни.
Серумни антитела (реакция за свързване на комплемента)	Серум	Моновета, СТ, 24 ч. при 4°C, >24 ч.	
3.Вируси			
<i>Influenza virus A, B</i>	Бързи антигенни реакции ДИФ Вирусно култивиране Реакции за амплификация на НК ^c	Назални аспирати, Назален смив, Назофарингеален секрет, Гърлен смив, Гърлен секрет, Бронхоскопски взети материали. Транспортна среда за вируси (ВТС), При стайна температура до <2 ч; При 4°C до 5 дни ,или при -70°C > 5 дни	
<i>Adenovirus</i>	ДИФ Вирусно култивиране Реакции за амплификация на НК ^c		
<i>Parainfluenza virus 1–4</i>	ДИФ Вирусно култивиране Реакции за амплификация на НК ^c		
<i>Respiratory syncytial virus</i>	ДИФ Вирусно култивиране Реакции за амплификация на НК ^c		
<i>Human metapneumovirus</i>	Реакции за амплификация на НК ^c		
<i>Coronaviruses</i>	Реакции за амплификация на НК ^c		
<i>Rhinovirus</i>	Реакции за амплификация на НК ^c		
<i>Enteroviruses</i>	Вирусно култивиране Реакции за амплификация на НК ^c		
4.Паразити			
<i>Paragonimus westermani</i>	Директна микроскопия на плеврална течност и храчка с наличие на характерни яйца	Плеврална течност; храчка	Стерилен контейнер, пресни проби, 4°C до 60 min; консервирани проби, СТ, 60 мин –30 дни

Съкращения:

КУБ-киселиноустойчиви бактерии; БАЛ–бронхоалвеоларен лаваж; ДИФ-директна имунофлуоресценция; ЕІА - ензимен имунотест; ІD - имунодифузия; ІgG - имуноглобулин G; ІgM - имуноглобулин M; LA - латекс-аглутинация; MIF-микроимунофлуоресценция;

НТМ-нетуберкулозни микобактерии; СТ-стайна температура.

^a Чувствителността при небактеремични пациенти с пневмококова пневмония е 52% -78%; Чувствителността при бактериемични случаи на пневмококова пневмония е 80% -86%; Специфичността при възрастни е > 90%. Не се използва при деца. Проучванията съобщават за 21% -54% фалшиво-положителен процент при деца с носителство и без данни за пневмония и възрастни с хронична обструктивна белодробна болест (Carroll KC, 2016; Sinclair A,2013).

^b Понастоящем има мултиплексни панели, които съдържат *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydomypha pneumoniae* като част от цялостния респираторен синдром панел. Клиницистите трябва да проверят в лабораторията за местата, от които се взема материал, събиране и транспортиране, експлоатационни характеристики и време за изпълнение. По принцип избягвайте тампони с калциев алгинат и тампони с мини крайници за реакции за амплификация на НК.

Идентификацията на респираторния патоген улеснява избора на антибиотик за конкретния пациент (Musher DM,2014). В допълнение, идентифицирането на някои патогени като *Legionella spp*, грипни вируси и агентите на биотероризма имат важно значение за общественото здраве. При пациентите, нуждаещи се от хоспитализация, трябва да се изследват хемокултури преди прилагането на лечение, както и да се прави културелно изследване и микроскопия на препарати, оцветени по Грам на проби от експекторирана храчка и ако заболяването е тежко, както и тестове за антигени в урината за *Legionella pneumophila*. Препоръките за деца съответстват на тези за възрастни по отношение на това кога да се вземат проби за хемокултури и посевки на храчки, но се различават леко за другите лабораторни изследвания (Bradley JS,2011). Изследването за вирусни патогени е препоръчително, както в амбулаторни, така и в болнични условия (Bradley JS,2011). Съществуват няколко молекулярни метода за детекция на *M. pneumoniae* (Bradley JS,2011), както и такива за *Chlamydo-phyla pneumoniae*. Тестът за детекция на антигени на *S. pneumoniae* в урина не се препоръчва за употреба при деца поради слабата му специфичност (Bradley JS,2011). Лабораториите трябва да разполагат с механизъм за скрининг на приемливостта на пробите от храчка (за да се изключат тези, които са силно замърсени с орофарингеална микрофлора и не са представителни за дълбоко отхрочени проби), преди да се извърши рутинното културелно изследване. Пробите с лошо качество дават подвеждащи резултати и трябва да бъдат отхвърлени, тъй като интерпретацията ще бъде компрометирана. Ендотрахеалните аспирати или бронхоскопски взетите проби (включително "мини-бронхоалвеоларен лаваж" (БАЛ), могат да се изискват при хоспитализираните пациенти, които са интубирани или не са в състояние да предоставят материал от храчка. При пациенти с плеврален излив трябва да се извърши торакоцентеза. Микобактериалните инфекции трябва да присъстват в диференциалната диагноза на пневмониите, придобити в обществото, които не се повлияват от лечението за типичните причинители на ППО. *Mycobacterium tuberculosis* все още е важен патоген сред имигрантските популации. *Mycobacterium avium* е значим не само сред пациентите с HIV, но особено и при пациенти с хронична белодробна болест или муковисцидоза, както и при слаби жени на средна възраст или по-възрастни (Parrish SC,2008).

8.5. Микробиологични подходи в диагностиката на вътреболнична пневмония (ВБП) и вентилация-асоцирана пневмония (ВАП)

Вътреболничните и вентилаторно асоциираните пневмонии (ВБП и ВАП) често са причинени от мултирезистентни Грам-отрицателни бактерии или други бактериални патогени. Освен респираторни вируси, които могат да бъдат пренесени нозокомиално, вирусите и гъбичките са други, но по-редки причинители на ВБП и ВАП при имунокомпетентния пациент. В Таблица 20 са изброени микроорганизмите, които най-често се свързват с пневмонии в имунокомпетентни пациенти с ВБП и ВАП.

Таблица 20. Микробиологична диагностика на вътреболнична пневмония и вентилация-асоцирана пневмония (при имунокомпетентен пациент) (Miller J et al, 2018)

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Особености при транспортиране и оптимално транспортно време
1.Бактерии			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter spp</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Acinetobacter spp</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>MRSA</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Хемокултура; микроскопски препарати по Грам; Аеробно и анаеробно култивиране ^a	Хемолултури храчка; ендотрахеални аспирати; БАЛ; проба от бронхоскопска протектирана четкова биопсия; Белодробна тъкан;	Контейнер за хемокултура СТ, за <24 ч. Стерилни контейнери, на СТ до 2 ч. или при 4°C, за 2-24 ч.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Както по-горе; Тест за антиген в урина ^b	Както по-горе; урина;	Стерилен контейнер на СТ до 24 ч, или при 2°C– 8°C за 24 ч –14 дни.
Смесена анаеробна флора при аспирация	Препарати за микроскопия по Грам Култивиране ^a	Проба от протектирана четкова биопсия. ^a белодробна тъкан	Стерилна епруветка с 1 mL тиогликолат (за биопсичните проби; стерилен контейнер за тъкани; СТ до 2 ч; или при 4°C, >2–24 ч
<i>Legionella spp</i>	Култивиране на <i>Legionella</i> agar ; Реакции за амплификация на НК ^c	Индуцирана храчка; ендотрахеални аспирати БАЛ материал от протектирана четкова биопсия; белодробна тъкан ;	Стерилен съд, СТ до 2 ч; при 4°C, >2–24 ч
	антиген в урина (<i>L. pneumophila</i>)	Урина	Стерилен контейнер, СТ <24 ч.; при 4°C >24 ч –14 дни.
2.Гъбички			
<i>Aspergillus spp</i>	Оцветяване за гъбички, културелно изследване.	Ендотрахеални аспирати БАЛ материал от протектирана четкова биопсия	Стерилен съд, СТ до 2 ч; при 4°C, >2–24 ч.
	Хистология	Белодробна тъкан ;	Стерилен съд ; СТ до 2 ч; или контейнер с формалин ,СТ, 2–14 дни.
	Тест за доказване на галактоманан в серум ^d	Серум	Моновета при 4°C, ≤5 дни; При -70°C >5 дни
		БАЛ	Стерилен съд,СТ до 2 ч; При 4°C, >2–24 ч.

Таблица 20. (продължение)

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Особености при транспортиране и оптимално транспортно време
Вируси			
<i>Influenza virus A, B</i> <i>Parainfluenza virus</i> <i>Adenovirus</i> <i>RSV</i>	Бързи антигенни тестове ДИФ култивиране на вируси реакции за амплификация на НК	Назален смив; НФ секрет; ендотрахеален аспират БАЛ материал от протектирана четкова биопсия	Транспорт във ВТС при СТ или 4°C до 5 дни; при -70°C, >5 дни;

Съкращения:

БАЛ - бронхоалвеоларен лаваж; ДИФ - директна имуофлуоресценция; MRSA - метицилин-резистентен *Staphylococcus aureus*; НФ - назофарингеален; НК - нуклеинова киселина; RSV - респираторен синцитиален вирус; СТ - стайна температура.

^a Анеробна култура трябва да се извършва, само ако материалът е получен с протектирана четкова биопсия или катетър и транспортиран в анаеробен транспортен контейнер или чрез поставяне на четката в 1 mL бульон преди транспортиране.

^b Чувствителността при небактериемични пациенти с пневмококова пневмония е 52% -78%; Чувствителността при бактериемични случаи на пневмококова пневмония е 80% -86%; специфичност при възрастни е > 90%. Въпреки това, проучванията съобщават за 21% -54% фалшиво-положителен процент при деца с NP носители; няма данни за пневмония и възрастни с хронична обструктивна белодробна болест (Carroll KC,2016; Sinclair A ,2013).

^c Необходимо е да се съгласуват с лабораторията оптималните места за вземане на материал, характеристиките и времето за изпълнение на изследването.

^d Характеристики на изпълнение на тези тестове са разгледани в Zou M,2012 ; Onishi A,2012.

Препоръчва се неинвазивно вземане на проби от дихателните пътища както за ВБП, така и за ВАП (Kalil AC,2016). При пациентите, които не са на апаратна вентилация, могат да се използват проби, получени чрез спонтанно отхрочване, индуцирана хрчка или назотрахеален аспират при несъдействащи пациенти. При пациенти на апаратна вентилация се предпочитат ендоназотрахеални аспирати (Kalil AC,2016). Откриването на причинителя на пневмонията се основава на първоначалната микроскопия на препарати, оцветени по Грам и културелното изследване на ендотрахеални аспирати или хрчки. Намазка с липса на възпалителни клетки и отсъствие на потенциални патогени има много висока прогностична стойност. Посявките на ендотрахеални аспирати, въпреки че вероятно съдържат истинския патоген, по-често дават растеж на смесени култури, отколкото пробите, получени чрез бронхоскопски техники. Това може да доведе до допълнително ненужно антибиотично лечение. Често се извършва количествена оценка на инвазивно получените проби, като БАЛ и материал от протектирана четкова биопсия (Kalil AC,2016). Количествена оценка на бактериалния растеж над определен праг е диагностична за пневмонията, а количествата под този праг се определят като колонизация. Общоприетите прагове са както следва:

- за ендотрахеални аспирати - 10^6 колони-образуващи единици (КОЕ) / mL;
- БАЛ - 10^4 КОЕ/ mL;
- материали от протектирана четкова биопсия - 10^3 КОЕ / mL (Kalil AC,2016).

Количествените проучвания изискват продължителна и обширна лабораторна дейност и специализирани процедури, а по-малките лаборатории може да не извършват такива. Въпреки това проучванията показват намалена употреба на антибиотици при извършване на количествените културелни изследвания (Kalil AC,2016). Бронхиалният смив не е подходящ материал за рутинно културелно изследване.

8.6. Микробиологични подходи в диагностиката на инфекции на плевралното пространство

Застаряването на населението, наред с други фактори, е довело до увеличаване на честотата на инфекциите, причинени от *S. pneumoniae* (Corcoran JP, 2015). Инфекциозните причинители на плевралния излив се различават при придобитите в обществото и вътреболничните инфекции. В голямо мултицентрово проучване (MIST1) на 454 възрастни пациенти с плеврална инфекция за оценка на лечението със Стрептокиназа, основните установени патогени, подредени в низходящ ред по честота, са: *S. anginosus*, *S. aureus*, анаеробни бактерии, други *стрептококи*, *Enterobacteriaceae* и *S. pneumoniae* (Maskell NA,2005). Сред пациентите с нозокомиална инфекция *S. aureus* е на първо място в списъка, като поне половината от тях са резистентни към метицилин, следвани от *Enterobacteriaceae*, стрептококите от групата на *S.anginosus*, *Enterococcus spp* и *анаеробите* (Maskell NA,2005; Menzies SM,2011). В Таблица 21 са обобщени основните патогени при инфекции на плевралното пространство. При всяка течност в плевралното пространство трябва да се вземе проба чрез торакоцентеза. Пробите трябва да бъдат изпратени веднага в лабораторията или поставени в подходящи анаеробни среди за транспортиране. В някои лечебни заведения се правят до леглото на болния в бутилки за хемокултури. Доказано е, че това увеличава чувствителността с 20% (Menzies SM,2011). Дори когато е извършено всичко необходимо, култивирането може да не даде растеж. Много полезни са лабораторно разработените реакции за амплификация на НК, насочени към някои пневмококови гени, като тези, които кодират пневмолизините и автолизините и могат да се изследват в проби от плеврална течност при педиатрични случаи (Corcoran JP,2015).

Таблица 21. Микробиологична диагностика на инфекциите на плевралното пространство (Miller J et al, 2018).

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Особености на транспорта и оптимално транспортно време
1.Бактерии			
Аероби			
<i>Staphylococcus aureus</i>	Оцветяване по Грам Културелно изследване	Плеврална течност	Стерилен контейнер, СТ, 2 ч; 4°C, >2–24 ч
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Както по-горе + Уринен антиген за <i>S. pneumoniae</i>	Урина, Плеврална течност	Стерилен контейнер, СТ, 24 h;при 2°C –8°C за24ч–14 дни; Стерилен контейнер, СТ,2 ч;при 4°C за 2–24 ч

Таблица 21. (продължение)

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Особености на транспорта и оптимално транспортно време
<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus anginosus</i> group Грам-отрицателни ентеробактерии <i>Enterococcus</i> spp <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Оцветяване по Грам Културелно изследване	Плеврална течност	Стерилен контейнер, СТ, 2 ч; при 4°C за 2–24 ч.
<i>Nocardia</i>	Оцветяване по Грам Модифицирано културелно изследване за киселиннорезистентни бактерии (селективни хранителни среди)		
<i>Legionella</i>	Оцветяване по Грам с контрастна боя Карболфуксин. Култивиране на <i>Legionella</i> агар	Плеврална течност	Стерилен контейнер, СТ, 2 ч; при 4°C за 2–24 ч
	<i>Legionella</i> уринен антиген (<i>L. pneumophila</i> серогрупа 1)	Урина	Стерилен контейнер, СТ до 24 ч; при 4°C, за 24 ч–14 дни.
Анаероби			
<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Prevotella</i> spp <i>Fusobacterium nucleatum</i> ; <i>Peptostreptococcus</i> <i>Actinomyces</i> spp.	Оцв. по Грам Анаеробно култивиране	Плеврална течност	Транспортна среда за анаероби, СТ, 72 ч;
Микобактерии			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Оцветяване за киселиннорезистентни бактерии Култивиране за микобактерии Реакции за амплификация на НК ^a	Плеврална течност	Стерилен контейнер, СТ, 2 ч; при 4°C за 2–24 ч
	Хистология	Плеврална или белодробна биопсия; плеврална течност	Стерилен контейнер, СТ, 2 ч; при 4°C до 3 дни Контейнер с формалин, СТ, 2–14 дни
2. Гъбички			
Fungi	Микроскопия на препарати оцветени за гъбички; Културелно изследване за гъбички	Плеврална течност, плеврална биопсия при някои заболявания.	Стерилен контейнер, СТ, 2 ч; при 4°C за 2–24 ч
<i>Candida</i> spp	Като по-горе, като може да се наблюдават и при оцветяване по Грам	Плеврална течност	Стерилен контейнер, СТ, 2 ч; При 4°C за 2–24 ч

Таблица 21. (продължение).

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Особености на транспорта и оптимално транспортно време
<i>Aspergillus</i>	Рутинни изследвания за гъбички (напр. микроскопия с характерните оцветителни методи, култивиране, серология) и галактоманнанов тест	БАЛ Серум	Стерилен контейнер, 4°C, ≤5 дни ; при -70°C >5 дни Моновета, СТ-2дни
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Микроскопски препарати, оцветени за гъбички Културелно изследване за гъбички Хистология	Плеврална течност	Стерилен контейнер, СТ, 2 ч; При 4°C за 2-24 ч
		Плеврална биопсия	Стерилен контейнер, СТ, 2 ч; при 4°C за 2-24 ч ; Контейнер с формалин за хистология, 2-14 дни
	Антигенен тест ^c	Серум, урина БАЛ, Плеврална течност	Моновета, СТ, 2дни; при 4°C, 2-14 дни Стерилен контейнер (урина и течност), СТ 2 ч; при 4°C до 2-72 ч,
	Серумни антитела (реакции за свързване на комплемента)	Серум	Моновета, СТ, 2дни; при 4°C, 2-14 дни
<i>Coccidioides immitis/posadasii</i>	Рутинни изследвания за гъбички (напр. микроскопия с характерните оцветителни методи, култивиране, серология) и хистология	Плеврална течност; плеврална биопсия	Стерилен контейнер, СТ, 2 ч; при 4°C за 2-24 ч
	Серумни антитела IgM (ID, LA, EIA) IgG антитела (реакция за свързване на комплемента, EIA)	Серум	Моновета , СТ,2дни; при 4°C, 2-14 дни.
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Култивиране и микроскопия с оцветителни методи за гъбички (но без серология) и хистология	Плеврална течност; плеврална биопсия	Стерилен контейнер, СТ, 2 ч; при 4°C за 2-24 ч
	Антигенен тест ^c	Урина,БАЛ, плеврална течност, серум	4°C, ≤5 дни

Таблица 21. (продължение).

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Особености на транспорта и оптимално транспортно време
3.Паразити			
<i>Paragonimus westermani</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Echinococcus</i> <i>Toxoplasma gondii</i>	<p>Директна микроскопия на препарат от плеврална течност и храчка за характерни яйца.</p> <p>Директна микроскопия на плеврална течност за характерните форми.</p> <p>Директна микроскопия на плеврална течност за наличие на сколекси Намазка оцветена по Гимза на материал от плеврална течност или биопсия</p>	<p>Плеврална течност</p> <p>Храчка</p> <p>Плеврална течност.</p>	<p>Стерилен контейнер; пресни проби при 4°C до 60 мин; консервирани проби, СТ >60 мин –30 дни.</p>

Съкращения:

БАЛ-Бронхоалвеоларен лаваж; НК-нуклеинови киселини; ЕІА - *ензимно-имунен анализ*; ІD - имунодифузия; ІgG - имуноглобулин G; ІgM - имуноглобулин M; LA - латекс-аглутинация; СТ - стайна температура.

^a Наличността зависи от лабораториите. Необходимо е да се съгласуват с лабораторията оптималните места за вземане на материал, характеристиките и времето за изпълнение на изследването

^b Характеристиките на извършване на тези тестове са разгледани от Zou M,2012 ; Onishi A, 2012.

^c Може да реагира кръстосано с други ендемични микози.

Плевралната течност трябва да се изпраща за изследване броя на клетките, рН, белтък, глюкоза, лактат дехидрогеназа (LDH) и холестерол. Тези стойности подпомагат разграничаването между трансудат или ексудат и насочват към следващото поведение. Счита се, че най-добрите предиктори за наличие на ексудативен процес са нивото на холестерола в плевралната течност > 55 mg / dL и LDH> 200 U / L или съотношението на холестерола в плевралната течност към серумния холестерол > 0,3 (Wilcox ME,2014). Повечето инфекции водят до отделяне на ексудат или на полиморфонуклеарни левкоцити (при емпием) в плевралната кухина. Когато туберкулозният или гъбичният патоген са вероятните причинители, изпращането на плеврална биопсия за културелно изследване и хистопатология увеличава диагностичната чувствителност. Винаги трябва да се уведомява лабораторията при съмнение за туберкулоза, така че да могат да се използват подходящи предпазни мерки.

8.7. Микробиологични подходи в диагностиката на белодробни инфекции при муковисцидоза

Пациентите с муковисцидоза страдат от хронични белодробни инфекции, дължащи се на нарушение на екзокринната функция, което не им позволява да се очистват от

микроорганизмите, навлизащи в дисталните въздухоносни пътища. Спектърът от микроорганизми, свързани с болестта, продължава да се разширява. В Таблица 22 са изброени най-често доказваните патогени при тези пациенти. В ранна детска възраст инфекциите се причиняват от микроорганизми, често наблюдавани и в педиатричната популация без муковисцидоза, като *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *S. aureus*. Разпространението на резистентността към метицилин при *Staphylococcus aureus* (MRSA) като причинители на педиатрични белодробни инфекции се е увеличило значително (Parkins MD, 2015). По-късно в детството или юношеството, *P. aeruginosa* става най-важният патоген, свързан с хроничната белодробна инфекция и последващата деструкция на белите дробове. Щамове на *P. aeruginosa* се адаптират към хипоксичния стрес на задържаните мукоидни секрети, чрез преминаване в биофилмов режим на растеж (с образуване на мукоидни колонии). Нозокомиални патогени като *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* и *Achromobacter ruhlandii* могат да бъдат придобити по време на престоя в болница. *Burkholderia cepacia* е много важен патоген при тези пациенти. *Burkholderia cenocepacia* е силно патогенен и е отговорен за бързото влошаване и смърт в подгрупата пациенти, придобили вирулентни щамове. Необходими са специални микробиологични техники за култивиране и диференциране на *B. cepacia* от мукоидните щамове на *P. aeruginosa*. По-рядко срещаните Грам-отрицателни организми, които изглежда увеличават честотата си, но чиято роля в патогенезата на муковисцидозата все още е неясна, включват *Burkholderia gladioli*, *Ralstonia spp*, *Cupriavidus spp*, *Inquilinus spp* и *Pandoraea* (Lipuma JJ, 2010; Hickey PW, 2009). Микрофлората при муковисцидозата е представена от Паркинс и Флото (Parkins MD, 2015).

Таблица 22. Микробиологична диагностика на белодробните инфекции при муковисцидоза (Miller J et al, 2018)

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Особености при транспортиране и оптимално транспортно време
1. Бактерии			
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> Enteric bacilli <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Achromobacter spp</i>	Културелни методи	Експекторирана храчка; гърлен секрет ^a ; други проби от дихателните пътища.	Стерилен контейнер, СТ до 2ч; при 4°C >2–24 ч,
<i>Burkholderia cepacia</i> complex	Култивиране на селективен <i>B. cepacia</i> –агар	Гърлен секрет ^a , експекторирана храчка други материали от дихателните пътища.	Стерилен контейнер, СТ до 2ч; при 4°C >2–24 ч,

Таблица 22. (продължение)

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Особености при транспортиране и оптимално транспортно време
<i>Неферментиращи глюкозата Грам-негативни пръчки</i> <i>Burkholderia gladioli</i> <i>Inquilinus spp</i> <i>Ralstonia spp</i> <i>Cupriavidus spp</i> <i>Pandoraea spp</i>	Културелни методи	Експекторирана хрчка гърлен секрет ^a ; други материали от дихателните пътища.	Стерилен контейнер, СТ до 2ч; при 4°C >2–24 ч
<i>Mycobacterium spp</i>			
<i>Mycobacterium abscessus</i> <i>Mycobacterium avium</i>	Културелни методи за изолиране на микобактерии	Експекторирана хрчка; бронхоскопски взети материали; други материали от дихателните пътища	Стерилен контейнер, СТ до 2ч; при 4°C >2–24 ч
2.Гъбички			
<i>Aspergillus spp</i> <i>Scedosporium spp</i> <i>Trichosporon</i>	Методи за оцветяване за гъбички; културелни методи за изолиране на гъбички	Експекторирана хрчка; бронхоскопски взети материали; други материали от дихателните пътища	Стерилен контейнер, СТ до 2ч; при 4°C >2–24 ч
3.Вируси			
<i>RSV</i> <i>Influenz</i> <i>Adenovirus</i> <i>Rhinovirus</i> <i>Coronavirus</i> <i>Parainfluenza virus</i> <i>Human metapneumovirus</i>	Бързи антигенни тестове DFA Културелни методи за изолиране на вируси Реакции за амплификация на НК ^b	Назален аспират или смив, назофарингеален секрет; гърлен смив; гърлен секрет; бронхоскопски взети материали ;	Транспорт във ВТС, при СТ или 4°C, 5дни; при –70°C, >5 дни

Съкращения: DFA- директна имунофлуоресценция; RSV - респираторен синцитиален вирус; СТ -стайна температура.

Опортюнистичните патогени като *нетуберкулозните микобактерии* (НТМ), изолирани с все по-голяма честота, варират от 6% до 30% при пациенти в зряла възраст (> 40 години) (Parkins MD,2015). *M. avium* и *Mycobacterium abscessus* са най-често срещаните НТМ (Parkins MD,2015). Предполага се, че и двата вида (*M. abscessus* и *M. avium*) допринасят за деструкцията на белите дробове и пациентите трябва да бъдат лекувани, когато културите са многократно положителни. Микобактериалното култивиране трябва да се добави към рутинните културелни методи на изследване при пациенти над 15-годишна възраст с екзацербации. Счита се, че честотата на *Mycobacterium spp* вероятно е подценена поради липса на редовно изследване на пациентите за тези микроорганизми (Lipuma JJ,2010). *Aspergillus fumigatus* е най-често срещаната гъбичка, установена при пациенти с муковисцидоза, която причинява основно алергично бронхопулмонално заболяване. *Scedosporium apiospermum* също може да причини подобен синдром. *Exophiala dermatitidis* се съобщава от някои центрове като

причинител на хронична колонизация на дихателните пътища при муковисцидоза (Lipuma JJ,2010). *Trichosporon mycotoxinivorans* също е патоген, който има склонност да причинява заболяване при пациенти с муковисцидоза (Hickey PW,2009). В Таблица 22 са обобщени най-честите микроорганизми, отговорни за обостряне на белодробните симптоми при пациенти с муковисцидоза (Parrish SC ,2015; Parkins MD,2015; Lipuma JJ,2009; Hickey PW,2010; Gilligan PH,2006; Pihet M,2006). Докато много от неферментативните Грам-отрицателни бактерии от околната среда често се установяват в храчките на тези пациенти, тяхната роля при муковисцидозата е или недоизяснена до момента или е малко вероятно да бъде от значение. Тези микроорганизми не са включени в таблицата.

8.8. Микробиологични подходи в диагностиката на пневмонии при имунокомпрометирани пациенти (Miller J et al, 2018)

Напредъкът в лечението на рака, прилагането на имуносупресивни средства, както и терапиите за автоимунни заболявания и *HIV* доведоха до увеличаване броя на имунокомпрометирани пациенти. Белодробните инфекции са най-честите причини за тежка заболеваемост и смъртност сред тези групи пациенти. Практически всеки потенциален патоген може да доведе до сериозно заболяване, а предизвикателството както за клиницистите, така и за микробиолозите е бързо да идентифицират инфекциозните причинители на белодробните инфекции. Вероятността за развитие на специфична инфекция може да бъде повлияна от наскоро приложената профилактика. Таблица 23 представя основните инфекциозни етиологични агенти, свързани с патологията у повечето имунокомпрометирани пациенти (Carroll KC,2016). Пациентите също са уязвими към обичайните бактериални и вирусни причинители на ППО и ВБП. В допълнение, гъбичките, херпесните вируси и протозоите играят по-важна роля и трябва да бъдат взети под внимание.

Таблица 23. Микробиологична диагностика на пневмониите при имунокомпрометирани пациенти (Miller J et al, 2018)

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Особености при транспортиране и оптимално транспортно време
1.Бактерии			
Вж. списъка на бактериалните причинители на ППО и ВБП	Вж. Таблица 20	Вж. Таблица 20	Вж. Таблица 20
Допълнителни бактериални патогени, от медицински интерес	Оцветяване по Грам Културелно изследване	Експекторирана храчка; бронхоскопски взети материали.	Стерилен съд , на СТ до 2 ч; при 4°C, до 2–24ч.
<i>Salmonella</i> (нетифоидни) <i>Elizabethkingia meningoseptica</i> <i>Listeria monocytogenes</i>			

Таблица 23. (продължение)

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Особености при транспортиране и оптимално транспортно време
<i>Nocardia</i> и др.аеробни <i>Actinomycetes</i>	Оцветяване по Грам модифицирани методи за култивиране на киселинноустойчиви бактерии (в селективни хранителни среди)	Експекторирана храчка; bronхоскопски взети материали белодробна тъкан	Стерилен съд, на СТ до 2 ч; при 4°C, до 2–24ч.
<i>Rhodococcus</i>	Оцветяване по Грам, Култивиране		
2.Вируси			
Респираторни вируси	Вж. таблици 19 и 20	Вж. таблици 19 и 20	Вж. таблици 19 и 20
Cytomegalovirus	Клетъчни култури с тестове за антигенна детекция; цитологичен анализ и/или хистология на тъкани за интерпретация.	Експекторирана храчка; bronхоскопски взети материали белодробна тъкан	Вирусна транспортна среда (ВТС) при 4°C до 5дни; при –70°C, >5 дни
	Реакции за амплификация на НК ^a	Плазма, БАЛ	Моновета, СТ, 30мин ; при 4°C, 30мин-24ч
	Количествена антигенемия (губеща предимство пред реак. за амплификация на НК)	Плазма	EDTA моновета, СТ, 6– 8ч; при 4°C, >8–24ч.
Herpes simplex virus	Култивиране комбинирано с тестове за антигенна детекция да се прави и цитологичен анализ и/или хистология на тъкани за интерпретация. Реакции за амплификация на НК.	Хистопатология на bronхоскопски взети материали (протектирана четкова биопсия) белодробна тъкан	Транспорт във ВТС, при 4°C до 5 дни; при –70°C, >5 дни.
<i>Mycobacterium</i> spp			
<i>M. tuberculosis</i>	Оцветяване за киселинноустойчиви бактерии; култивиране; реакции за амплификация на НК; хистология	Експекторирана храчка; bronхоскопски взети материали; белодробна тъкан	Стерилен съд, На СТ до 2 ч; При 4°C, до 2–24ч.
<i>M. avium intracellulare</i> complex <i>M. kansasii</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. abscessus</i>	Оцв. за киселинноустойчиви бактерии; Култивиране;	Експекторирана храчка; bronхоскопски взети материали;	Стерилен съд, на СТ до 2 ч; при 4°C, до 2–24ч.
	Хистология	Белодробна тъкан	Контейнер с формалин, СТ, 2–14 дни.

Таблица 23. (продължение)

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимальни материали за изследване	Особености при транспортиране и оптимално транспортно време
3. Гъбички			
<i>Pneumocystis jirovecii</i> ^b	ДИФ на БАЛ или храчка (не на тъкан) Реакции за амплификация на НК ^a Цитологични оцветителни методи (за течни проби)	Експекторирана храчка; индуцирана храчка Бронхоскопски взети материали;	Стерилен съд, СТ до 2 ч; при 4°C, 2 ч–7 дни.
	Препарати от тъкани оцветени по спец. методи	Тъкани	При СТ до 2ч; При 4°C, >2–24 ч; Контейнер с формалин, СТ, 2–14 дни
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Оцветяване за гъбички Култивиране	Експекторирана храчка; индуцирана храчка бронхоскопски взети материали;	Стерилен съд , На СТ до 2 ч; При 4°C, до 2–24ч.
	Криптококов антигенен тест	Серум 1 mL	Моновета, СТ, 1 ч; при 4°C, >1 ч–7 дни
	Препарати от тъкани оцветени по специални методи	Тъкани	Контейнер с формалин на СТ, 2-14 дни Стерилен контейнер на СТ до 2 ч; при 4°C, до 2–24ч.
<i>Aspergillus</i> spp	Оцветяване за гъбички Култивиране	Експекторирана храчка; индуцирана храчка; бронхоскопски взети материали; белодробна тъкан	Стерилен съд , на СТ до 2 ч; при 4°C, до 2–24ч.
	Тест за доказване на галактоманан	Серум БАЛ ^c	Моновета, 4°, ≤5 дни; при –70°C, >5 дни; Стерилен контейнер за БАЛ, при СТ до 2 ч; при 4°C, >2–24 ч.
<i>Fusarium</i> spp	Оцветяване за гъбички; Култивиране;	Експекторирана храчка; индуцирана храчка	Стерилен съд , на СТ до 2 ч; при 4°C, до 2–24ч.
	Хистология с оцветяване	Бронхоскопски взети материали; Белодробна тъкан	Стерилен съд , на СТ до 2 ч; при 4°C, до 2–24ч. Контейнер с формалин, СТ, 2–14 дни
	Хемокултура за гъбички (вж. секцията за хемокултури)	Кръв във флакон за аеробни хемокултури	на СТ до 4 ч
<i>Zygomycetes</i> като <i>Rhizopus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Absidia</i> spp)	Оцветяване за гъбички; Култивиране;	Експекторирана храчка; индуцирана храчка; бронхоскопски взети материали;	Стерилен съд , на СТ до 2 ч; при 4°C, до 2–24ч.
<i>Pseudoallescheria boydii</i>		белодробна тъкан	

Таблица 23. (продължение)

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Особености при транспортиране и оптимално транспортно време
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Оцветяване за гъбички; Култивиране;	Експекторирана хрчка; индуцирана хрчка; бронхоскопски взети материали; белодробна тъкан	Стерилен съд , на СТ до 2 ч; при 4°C, до 2–24ч.
	Хемокултура за гъбички (вж. секцията за хемокултури)	Кръв във флакон за аеробни хемокултури	на СТ до 4 ч
	Антигенен тест	Серум, урина ,БАЛ, плеврална течност	Моновета за серум, СТ до 2 дни; при 4°C, 2–14 дни Стерилен контейнер за други проби, 4°C, ≤5 дни
	Серология (реакция за свързване на комплемента)	Серум	на СТ до 2 дни при 4°C, 2–14 дни
<i>Coccidioides immitis/posadasii</i>	Оцветяване за гъбички; Култивиране;	Експекторирана хрчка; индуцирана хрчка; бронхоскопски взети материали; белодробна тъкан	Стерилен съд , на СТ до 2 ч; при 4°C, до 2–24ч.
	Серумни антитела IgM (ID, LA, EIA) IgG антитела (св. на комплемента, EIA)	Серум	Моновета, СТ, 2 дни; при 4°C, 2–14 дни
Other endemic fungi	Оцветяване за гъбички; култивиране;	Експекторирана хрчка; Индукцирана хрчка; Бронхоскопски взети материали; Белодробна тъкан	Стерилен контейнер , На СТ до 2 ч; При 4°C, до 2–24ч.
	Антигенен тест (<i>Blastomyces</i>)	Серум, урина ,БАЛ, Плеврална течност	Моновета за серум, При СТ до 2 дни; При 4°C, 2–14 дни Стерилен контейнер за други проби, 4°C, ≤5 дни
4. Паразити			
<i>Toxoplasma gondii</i>	Микроскопия – намазка оцв. по Гимза (за тъкани) Реакции за амплификация на НК ^a	Индукцирана хрчка; Бронхоскопски взети материали; Белодробна тъкан	Стерилен контейнер на СТ до 2 ч; при 4°C, до 2–24ч.
	Детекция на IgM антитела	Серум	Моновета, СТ, 2 дни; при 4°C, 2–14 дни

Таблица 23. Микробиологична диагностика на пневмониите при имунокомпрометирани пациенти (Miller J et al, 2018)

Етиологични агенти	Диагностични процедури	Оптимални материали за изследване	Особености при транспортиране и оптимално транспортно време
<i>Enterocytozoon bieneusi</i> (<i>Microsporidiosis</i>)	Хистология	Белодробна тъкан	Контейнер с формалин; СТ, 2–14 дни
	Модифицирано трихромно оцветяване. Реакции за амплификация на НК	Индуцирана храчка; Бронхоскопски взети материали;	Стерилен контейнер, на СТ до 2 ч; при 4°C, до 2–24ч.
<i>Cryptosporidiosis</i>	Модифицирано оцветяване за киселинноустойчиви бактерии ДИФ Реакции за амплификация на НК ^a		
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Хистология	Белодробна тъкан	Контейнер с формалин на СТ, 2–14 дни
	Микроскопия на течни проби за ларвени форми. Култивиране (консултация с лабораторията дали се извършва такава)	Индуцирана храчка; бронхоскопски взети материали;	Стерилен контейнер, на СТ до 2 ч; при 4°C, до 2–24ч.
	Хистология	Белодробна тъкан	Контейнер с формалин, СТ, 2–14 дни

Съкращения: БАЛ-бронхоалвеоларен лаваж; ППО-пневмония, придобита в обществото; ДИФ - директна имунофлуоресценция; EDTA - етилендиаминтетраоцетна киселина; EIA - ензимно-имунен анализ, ВБП – вътреболнична пневмония; ID - имунодифузия; IgG - имуноглобулин G; IgM - имуноглобулин M; LA - латекс-аглутинация; СТ- стайна температура; ВТС - вирусна транспортна среда.

^a Необходимо е да се съгласуват с лабораторията оптималните места за вземане на материал, характеристиките и времето за изпълнение на изследването

^b Повишеното ниво в серум или БАЛ на β-d-глюкана е силно показателно за инфекция с *P. jirovecii*. Положителният резултат трябва да бъде последван от реакции за амплификация на НК или ДИФ.

^c Само галактоманан –тестове са одобрени от FDA.

Когато бързите и неинвазивни тестове като тестове за уринен или серумен антиген и бързата вирусологична диагностика не са достатъчно информативни, се изискват по-специфични процедури за вземане на проби от белите дробове. Могат да се извършат няколко диагностични процедури, но обикновено пациентът първоначално се подлага на бронхоскопия с БАЛ с или без трансбронхиална биопсия. Когато инфилтратът е фокален, важно е да се постави ендоскопа в белодробния сегмент, съответстващ на аномалиите на рентгенографията; в противен случай при дифузно заболяване обхватът обикновено е съсредоточен в десния среден лоб или около лингулата. Препоръчва се микробиологичните лаборатории в сътрудничество с лекарите по инфекциозни болести и пулмолозите да разработят алгоритъм за обработка на проби, който да включва тестване за всички основни категории патогени, както е обобщено в таблицата. Често са нужни цитологични анализи и/или хистопатология, за да се интерпретира прецизно значимостта на положителните реакции за амплификация на НК или културелните методи за изолиране на херпесни вируси, както и окончателната детекция на

филаментозните гъбички. Трябва да се отбележи обаче, че само хистопатологията не е достатъчно чувствителна, за да се диагностицират гъбичните инфекции и трябва да бъде придружена от имунологично оцветяване, културелно изследване, а когато са налични - и реакции за амплификация на НК (Carroll KC, 2016; Sangoi AR, 2009). В допълнение БАЛ и галактоман 1-3 β -D-глюкан - серумните тестове могат да бъдат полезни. Въпреки това, цитологията и/или хистопатологията са доста по-полезни при разграничаването на състояния като белодробен кръвоизлив и отхвърлянето на инфекциозни причини за инфекциите. Трансторакална иглена биопсия, биопсии под компютър-томографски контрол на плеврални лезии, както и отворени операции на белите дробове също могат да бъдат взети под внимание, ако не е възможна по-малко инвазивна диагностика.

8.9. Литература

1. Bradley JS, Byington CL, Shah SS, et al. The management of community acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2011; 53:e25–76.
2. Bordetella cultures 3.11.6. In: *Clinical microbiology procedures handbook*, 4th ed. Leber AL, ed. Washington, DC: ASM Press, 2016.
3. Carroll KC, Adams LL. Etiology, epidemiology and diagnosis of lower respiratory tract infections in immunocompromised patients. *Microbiol Spec* 2016;4:DMIH2-0029.
4. Chartrand C, Leeflang MM, Minion J, Brewer T, Pai M. Accuracy of rapid influenza diagnostic tests: a meta-analysis. *Ann Intern Med* 2012; 156:500–11.
5. Corcoran JP, Wrightson JM, Belcher E, DeCamp MM, Feller-Kopman D, Rahman NM. Pleural infection: past, present, and future directions. *Lancet Respir Med* 2015; 563–77.
6. Gilligan PH, Kiska DL, Appleman MD, eds. *Cumitech 43: cystic fibrosis microbiology*. Washington, DC: ASM Press, 2006.
7. Gopi A, Madhavan SM, Sharma SK, Sahn SA. Diagnosis and treatment of tuberculous pleural effusion in 2006. *Chest* 2007; 131:880–9.
8. Hasegawa K, Mansbach JM, Camargo CA Jr. Infectious pathogens and bronchiolitis outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12:817–28.
9. Hickey PW, Sutton DA, Fothergill AW, et al. *Trichosporon mycotoxinivorans*, a novel respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2009;47:3091–7.
10. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, et al. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis* 2016; 63:e61–111.
11. Lewinsohn DM, Leonard MK, LoBue PA, et al. Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention clinical practice guidelines: diagnosis of tuberculosis in adults and children. *Clin Infect Dis* 2017; 64:e1–33.

12. Lipuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23:299–323.
13. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44(Suppl 2):S27–72.
14. Mansbach JM, Piedra PA, Teach SJ, et al; MARC-30 Investigators. Prospective multicenter study of viral etiology and hospital length of stay in children with severe bronchiolitis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2012; 166:700–6.
15. Maskell NA, Daview CWH, Nunn AJ, et al; First Multicenter Intrapleural Sepsis Trial (MIST1). U.K. controlled trial of intrapleural streptokinase for pleural infection. *N Engl J Med* 2005; 865–74.
16. Menzies SM, Rahman NM, Wrightson JM, et al. Blood culture bottle culture of pleural fluid in pleural infection. *Thorax* 2011; 66:658–62.
17. Musher DM, Thorner A. Community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 2014;371:1619–27.
18. Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, et al. Diagnostic accuracy of serum 1,3-β-D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2012; 50:7–15.
19. Parrish SC, Myers J, Lazarus A. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections in non-HIV patients. *Postgrad Med* 2008; 120:78–86.
20. Parkins MD, Floto RA. Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2015; 14:293–304.
21. Pihet M, Carrere J, Cimon B, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis—a review. *Med Mycol* 2009; 47:387–97.
22. Ralston SL, Lieger AS, Meissner HC, et al. Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. *Pediatrics* 2014;134:e1474–1502.
23. Sangoi AR, Rogers WM, Longacre TA, Montoya JG, Baron EJ, Banaei N. Challenges and pitfalls of morphologic identification of fungal infections in histologic and cytologic specimens: a ten-year retrospective review at a single institution. *Am J Clin Pathol* 2009; 131:364–75.
24. Sinclair A, Xie X, Teltscher M, Dendukuri N. Systematic review and meta-analysis of a urine-based pneumococcal antigen test for diagnosis of community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2013; 51:2303–10.
25. Wilcox ME, Chong CA, Stanbrook MB, Tricco AC, Wong C, Straus SE. Does this patient have an exudative pleural effusion? The Rational Clinical Examination systematic review. *JAMA* 2014; 311:2422–31.
26. Zou M, Tang L, Zhao S, et al. Systematic review and meta-analysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis. *PLoS One* 2012; 7:1–12.