

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

Д.Л. Пиневиц 2019 г.

Регистрационный № *027-0319*



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОМИНИРУЮЩЕЙ МИКРОФЛОРЫ
В БИОМАТЕРИАЛЕ ИЗ ТРАХЕОБРОНХИАЛЬНОГО ДЕРЕВА
ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ ОБОСТРЕНИИ
ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ ЛЕГОЧНОЙ БОЛЕЗНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Д. Ю. Рузанов, канд. мед. наук, доц.
Е. В. Воропаев, О. В. Осипкина, д-р биол. наук, доц. О. Ю. Баранов, А. А. Зяцьков,
В. А. Воробей, С. В. Миронова, канд. мед. наук, доц. И. В. Буйневич

Гомель 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц

25.04.2019

Регистрационный № 027-0319

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОМИНИРУЮЩЕЙ МИКРОФЛОРЫ
В БИОМАТЕРИАЛЕ ИЗ ТРАХЕОБРОНХИАЛЬНОГО ДЕРЕВА
ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ ОБОСТРЕНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ
ОБСТРУКТИВНОЙ ЛЕГОЧНОЙ БОЛЕЗНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Д. Ю. Рузанов, канд. мед. наук, доц.
Е. В. Воропаев, О. В. Осипкина, д-р биол. наук, доц. О. Ю. Баранов, А. А. Зяцьков,
В. А. Воробей, С. В. Миронова, канд. мед. наук, доц. И. В. Буйневич

Гомель 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения доминирующей микрофлоры в биоматериале из трахеобронхиального дерева при инфекционном обострении хронической обструктивной легочной болезни (ХОБЛ). Метод включает применение защищенной щеточной браш-биопсии для получения биологического материала из нижних дыхательных путей при инфекционном обострении ХОБЛ, а также молекулярно-генетическое исследование с целью определения видового состава микробных сообществ путем анализа размеров терминальных рестрикционных фрагментов области гена 16S рибосомальной РНК бактерий (рРНК).

Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на определение доминирующей микрофлоры при инфекционном обострении ХОБЛ, с целью дальнейшей коррекции эмпирической терапии.

Инструкция предназначена для врачей-пульмонологов, врачей-терапевтов, врачей-эндоскопистов, врачей лабораторной диагностики и врачей иных специальностей, оказывающих медицинскую помощь пациентам, которым необходимо назначение этиотропной антибактериальной терапии в стационарных и амбулаторных условиях при инфекционном обострении ХОБЛ.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Таблица 1. — Изделия медицинской техники для пробоподготовки и проведения молекулярно-генетического анализа (набор оборудования для проведения молекулярно-генетического анализа)

Защищенная щеточная браш-биопсия для получения биоматериала
Щетка цитологическая одноразовая с защитным каналом (канал 2,0 мм, длина 1050 мм)
Медицинские ножницы или металлические кусачки с возможностью стерилизации
Пробирки 1,5 мл с транспортной средой
Фибробронхоскоп с каналом не менее 2,0 мм
Пробоподготовка и выделение ДНК
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10 000–15 000×g), диапазон рабочих температур от 0 до 25 °С
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур от -10 до +99 °С)
Микроцентрифуга-вортекс
Насос с колбой-ловушкой
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 10–100; 100–1000 мкл)
Спектрофотометр с возможностью комплексной оценки нуклеиновых кислот
Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
УФ-стерилизатор, или его аналог

ПЦР-реакция
Амплификатор (термоциклер)
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга-вортекс
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур от -10 до + 99 °С
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 100–1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
Фрагментный анализ областей гена 16S рРНК
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10 000–15 000×g), диапазон рабочих температур от 0 до 25 °С
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур от -10 до + 99 °С
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 10–100; 100–1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
Система для гель-электрофореза с набором модулей (включая источник питания) и аксессуаров
УФ-трансиллюминатор
Видеосистема для регистрации гелей в комплекте с компьютером
Генетический анализатор (с модулем электрофоретического фракционирования фрагментов нуклеиновых кислот)

Также необходимы следующие изделия медицинского назначения: транспортная среда с консервантом и муколитиком, наборы реагентов для экстракции и очистки ДНК, реагенты для амплификации, эндонуклеазной рестрикции, для горизонтального электрофореза в агарозном геле, для электрофоретического анализа фрагментов нуклеиновых кислот с использованием генетического анализатора, микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл, ПЦР-пробирки, соответствующие типу используемого амплификатора (термоциклера), наконечники без фильтра, наконечники с фильтром объемом 10, 20, 200, 1000 мкл, халаты, резиновые перчатки и др.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Хроническая обструктивная легочная болезнь неуточненная (J44.9), хроническая обструктивная легочная болезнь с обострением неуточненная (J44.1), хроническая обструктивная легочная болезнь с острой респираторной инфекцией нижних дыхательных путей (J44.0), другая хроническая обструктивная легочная болезнь (J44), другая уточненная хроническая обструктивная легочная болезнь (J44.8).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Непереносимость препаратов, применяемых для местной анестезии при фибробронхоскопии.

2. Инфаркт миокарда, перенесенный менее 6 мес. назад.
3. Острый инсульт.
4. Нарушение сердечного ритма (выше III степени).
5. Легочно-сердечная и сердечно-сосудистая недостаточность III степени.
6. Стеноз гортани и (или) трахеи II–III степени.
7. Нервно-психические заболевания (эпилепсия, состояние после черепно-мозговой травмы, шизофрения).
8. Болевой синдром в брюшной полости.
9. Крайне тяжелое состояние больного, когда уточнение диагноза уже не может повлиять на лечебную тактику.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод основан на молекулярно-генетической оценке размеров фрагментов гипервариабельной области гена 16S рРНК бактерий, являющегося наиболее распространенным маркерным геном бактерий, таксоноспецифичные участки которого используются для видовой идентификации микроорганизмов, в т. ч. и труднокультивируемых. Данный анализ можно проводить с использованием дорогостоящего высокопроизводительного секвенирования или методом анализа размеров терминальных участков рестрикционных фрагментов, основанного на комбинировании методов ПЦР-амплификации с применением меченых олигонуклеотидных праймеров и эндонуклеазной рестрикции. Метод включает применение защищенной щеточной браш-биопсии для получения биологического материала из нижних дыхательных путей при инфекционном обострении ХОБЛ с целью предотвращения контаминации микрофлорой из ротовой полости и верхних дыхательных путей. В качестве материала используются браш-биоптаты слизистой оболочки бронхов пациента.

Взятие и транспортировка биологического материала

1. Подготовка пациента к бронхоскопии, местная анестезия, обработка аппарата не имеет особенностей.
2. При прохождении аппаратом через верхние дыхательные пути и интубации трахеи вакуумный насос должен быть выключен для исключения контаминации щеточного катетера при продвижении через манипуляционный канал бронхоскопа.
3. При наличии локального воспалительного процесса (bronхоэктазия, пневмония, гнойная деструкция) биопсия берется из дренирующего бронха на уровне дистальных отделов (bronхи 12–18 порядка). Для этого тубус бронхоскопа устанавливается в просвет сегментарного/субсегментарного бронха, щеточный катетер выдвигается на длину 6–7 см (для базальных отделов) или 4–5 см (для верхних отделов). В качестве линейного расстояния используется отрезок между большим и указательным пальцами, фиксирующими катетер, и клапаном манипуляционного канала. Максимальная длина выдвижения щеточного катетера во избежание ятрогенного пневмоторакса составляет 11 см (для базальных отделов) или 8 см (для верхних отделов). Затем щетка выдвигается на максимальную длину, и выполняется 5–6 тракций с амплитудой 1,0–1,5 см без

увеличения длины проникновения катетера. Впоследствии щетка возвращается в катетер и извлекается из манипуляционного канала. Процедура бронхоскопии заканчивается в обычном режиме, при необходимости проводится санация, эндотрахеальное введение антибиотиков, муколитиков.

4. Для помещения материала в транспортный раствор щетка выдвигается на максимальную длину, помещается в пробирку и откусывается кусочками. В качестве транспортной среды для молекулярно-генетических исследований используется раствор без денатурирующих свойств с консервантом и муколитиком. Пробирки с пробами плотно закрываются, маркируются и транспортируются в лабораторию.

5. В связи с определенным низким риском легочного кровотечения и травматического пневмоторакса пациент должен находиться под наблюдением 24 ч после фибробронхоскопии.

Экстракция ДНК, ПЦР и электрофоретическая детекция

Можно использовать готовые коммерческие наборы, позволяющие выделять ДНК из небольшого количества образца. Для определения качественных и количественных характеристик ДНК производят спектрофотометрический анализ. Для дальнейшего анализа используют образцы, соотношение экстинкций A_{260}/A_{280} которых $\geq 1,67$, $A_{260}/A_{230} \geq 1,90$, $A_{320} \rightarrow 0$.

Для амплификации гипервариабельной области гена 16S рРНК бактерий используется метод ПЦР. Структура праймеров (5'-3'): прямой FAM – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, обратный HEX – CCGTCAATTCCTTTRAGTTT. С целью последующей детекции фрагментов ДНК оптическим модулем генетического анализатора в структуру прямого праймера (5'-конец) интегрируется флуоресцентный краситель FAM, а в структуру обратного (5'-конец) — HEX. Для проведения ПЦР можно использовать готовые коммерческие смеси, программа ПЦР стандартна для амплификации длинных фрагментов, температура отжига — 55 °С. Для предварительной детекции продуктов ПЦР производят горизонтальный гель-электрофорез с последующим окрашиванием раствором бромистого этидия (концентрация 0,1–0,5 мкг/мл). Для визуализации полученных результатов и цифрового фотодокументирования изображения используют специализированную (для УФ-сканирования) видеосистему и соответствующее программное обеспечение. Результат ПЦР-амплификации: наличие электрофоретической зоны размером ≈ 900 пар нуклеотидов (п.н.), характеризующейся, как правило, выраженной диффузной структурой (разные по размеру ампликоны), что связано с содержанием генетического материала более чем одного вида микроорганизмов. На рисунке 1 в качестве иллюстрации приведена электрофоретическая детекция амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК.

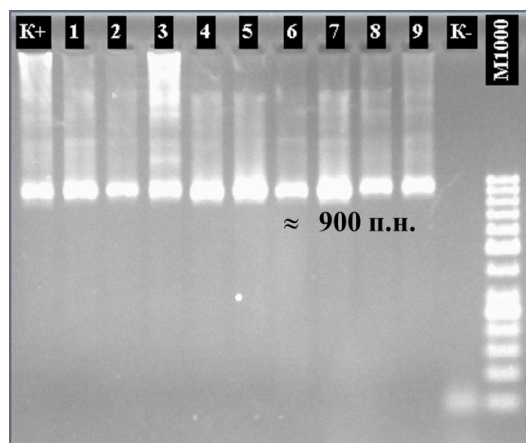


Рисунок 1. — Электрофоретическая детекция амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК

Интерпретация результатов электрофоретического фракционирования, представленных на рисунке 1: в качестве отрицательного контроля К- использована вода (амплификация отсутствует); положительный контроль — образец № К+ — амплифицируется фрагмент размером ≈ 900 п.н.; для образцов № 1–9 получены ампликоны с прогнозируемой по размеру зоной.

Рестрикционный анализ ампликонов, для определения состава бактериальной микрофлоры выполняют с применением рестриктаз (эндонуклеаз рестрикции) согласно инструкции компании-производителя. В данной инструкции приведены результаты анализа с использованием эндонуклеазы MspI. Для анализа микробиомов рестриктаза MspI является наиболее информативной по сравнению с другими эндонуклеазами (AvaI, HaeIII, HhaI, MboI, MvaI, TaqI и др.), что связано с высоким уровнем варьирования расположения сайта C[^]CGG среди различных видов бактерий и соответственно, возможностью дифференцировать значительное количество генотипических вариантов, ассоциированных с таксономической принадлежностью бактериальных организмов.

Интерпретация результатов

При электрофоретическом анализе высокой степени разрешения используют генетический анализатор и специализированные программные пакеты, предназначенные для оценки электрофоретических спектров (GeneMapper или аналогичные). Размер терминальных рестрикционных фрагментов вычисляется путем проекции вершины электрофоретических пиков на ось X, количество (уровень сигнала) — на ось Y на основании сравнения с эталонными образцами (электрофоретическими стандартами) путем построения калибровочного графика. Расчет ожидаемого размера терминальных рестрикционных фрагментов проводят с помощью программного обеспечения, представленного в открытом доступе на интернет-ресурсах (NEBcutter или аналогичные). Сравнительный анализ расчетных и детектируемых электрофоретических данных позволяет сделать вывод о видовой принадлежности бактерий. В качестве примера на рисунке 2 представлены электрофоретический спектр терминальных рестрикционных фрагментов и рестрикционная карта, полученные после обработки рестриктазой MspI

фрагмента гена 16S рРНК контрольного образца *Staphylococcus aureus* (АТСС 25923).

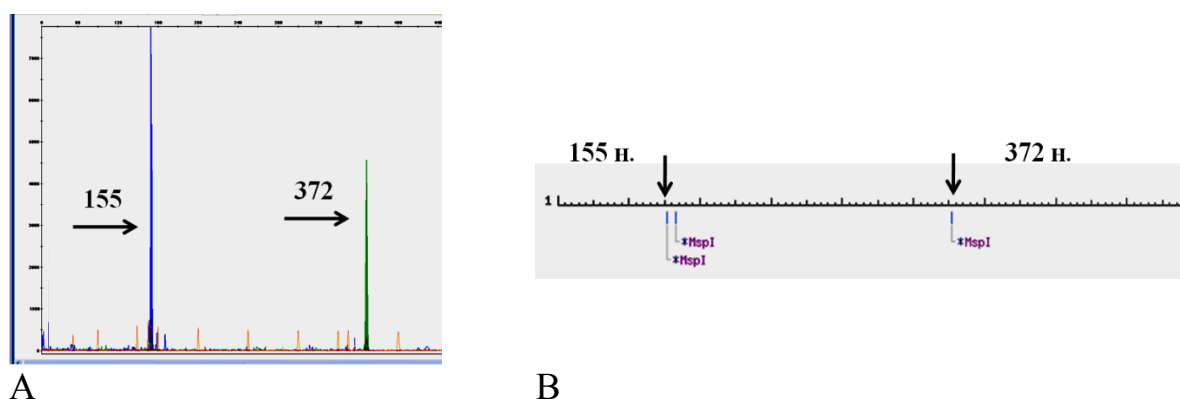


Рисунок 2. — Электрофоретический спектр терминальных рестриционных фрагментов (А) и рестриционная карта фрагмента гена 16S рРНК контрольного образца *Staphylococcus aureus* (АТСС 25923) (В)

Как видно из рисунка 2, на электрофореграмме присутствуют два пика, соответствующих терминальным рестриционным фрагментам размером 155 и 372 нуклеотидных оснований, получаемых при фрагментации ампликона. Полученные результаты соответствуют данным рестриционной карты фрагмента гена 16S рРНК *Staphylococcus aureus* (рестрикция MspI), созданной с помощью программного обеспечения (верифицировано при помощи секвенирования и последующей идентификации в GenBank NCBI). Использование разработанного метода позволяет определить широкий спектр родов микроорганизмов в смешанном микробном сообществе: например, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Mycoplasma*, *Klebsiella*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Granulicatella*, *Veillonella* и др.

По результатам молекулярно-генетических исследований с использованием защищенных методик забора материала выявлены патогены, этиологически значимые в возникновении тяжелого инфекционного обострения ХОБЛ: *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*.

Для выявления данных видов в качестве альтернативы предлагается использовать метод классической ПЦР с последующей электрофоретической детекцией. Структура праймеров и ориентировочный размер ампликона представлены в таблицах 2–7.

Таблица 2. — Структура праймеров, используемых для выявления фрагмента гена пневмолизина (Ply) *Streptococcus pneumoniae*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента, п.н.
Ply — прямой	GTGATATTTCTGTAACAGCTACC	354
Ply — обратный	GAGAATTCCTGTCTTTTCAAA	

Программа амплификации: денатурация — 1 цикл (95 °С, 5 мин); 35 циклов (95 °С — 60 с, 55 °С — 60 с, 72 °С — 60 с); финальная элонгация — 1 цикл (72 °С — 10 мин).

Таблица 3. — Структура праймеров, используемых для выявления фрагмента гена О-ацетилазы (Oac) *Pseudomonas aeruginosa*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента, п.н.
(Oac)-прямой	CTGGGTTCGAAAGGTGGTTGTTATC	232
(Oac)-обратный	GCGGCTGGTGCGGCTGAGTC	

Программа амплификации: денатурация — 1 цикл (95 °С, 3 мин); 35 циклов (95 °С — 60 с, 63 °С — 30 с, 72 °С — 60 с); финальная элонгация — 1 цикл (72 °С — 10 мин).

Таблица 4. — Структура праймеров, используемых для выявления фрагмента гена тирозинаминотрансферазы (TyrB) *Klebsiella pneumoniae*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента, п.н.
TyrB -прямой	GGCTGTACTACAACGATGAC	931
TyrB -обратный	TTGAGCAGGTAATCCACTTTG	

Программа амплификации: денатурация — 1 цикл (95 °С, 5 мин); 35 циклов (95 °С — 60 с, 55 °С — 60 с, 72 °С — 60 с); финальная элонгация — 1 цикл (72 °С — 10 мин).

Таблица 5. — Структура праймеров, используемых для выявления фрагмента гена β-субъединицы бактериальной РНК-полимеразы (RpoB) *Acinetobacter baumannii*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента, п.н.
RpoB-прямой	CATAAACTGAGATAACTGGCTTGAACC	529
RpoB-обратный	CGTCGACTTCACSTTTACCGTTAC	

Программа амплификации: денатурация — 1 цикл (95 °С, 5 мин); 30 циклов (95 °С — 20 с, 66 °С — 30 с, 72 °С — 30 с); финальная элонгация — 1 цикл (72 °С — 7 с).

Таблица 6. — Структура праймеров, используемых для выявления фрагмента гена термонуклеазы (Nuc) *Staphylococcus aureus*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента, п.н.
Nuc-прямой	GCGATTGATGGTGATACGGTT	267
Nuc-обратный	AGCCAAGCSTTGACGAACTAAAGC	

Программа амплификации: денатурация — 1 цикл (95 °С, 3 мин); 37 циклов (94 °С — 60 с, 55 °С — 30 с, 72 °С — 90 с); финальная элонгация — 1 цикл (72 °С — 3,5 мин).

Таблица 7. — Структура праймеров, используемых для выявления фрагмента гена адгезина (*Adh*) *Mycoplasma pneumoniae*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента, п.н.
<i>Adh</i> -прямой	CCCTCGACCAAGCCAACCTC	309–339
<i>Adh</i> -обратный	TGCGCGTTGTTCTTGTGGTG	

Программа амплификации: денатурация — 1 цикл (95 °С, 5 мин); 40 циклов (94 °С — 30 с, 62 °С — 30 с, 72 °С — 30 с); финальная элонгация — 1 цикл (72 °С — 7 мин).

Разработанный метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на определение видового состава доминирующей микрофлоры в биоматериале из трахеобронхиального дерева при инфекционном обострении ХОБЛ, при котором необходимо назначение антибактериальных средств. При определении доминирующей патогенной микрофлоры необходима оптимизация этиопатогенетической терапии инфекционного обострения ХОБЛ, особенно у иммунокомпрометированных пациентов, что способствует профилактике развития различных дисбактериозов, возникающих на фоне антибиотикотерапии.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Молекулярно-генетическое исследование подразумевает соблюдение правил на всех этапах работы: взятие биоматериала, транспортировка, хранение и пробоподготовка; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. Несоблюдение данных правил приводит к возникновению ошибок, которые становятся причиной ложноотрицательных и ложноположительных результатов, неверной интерпретации и диагностики и соответственно, неправильно подобранной терапии, что в конечном итоге может нанести вред пациенту. Исследователи должны неукоснительно соблюдать методические инструкции и санитарные правила в отношении безопасности работы в ПЦР-лаборатории.

Причины появления ложноположительных результатов: контаминация исследуемых образцов различными биологическими агентами вирусной, бактериальной или иной природы, перекрестная контаминация от образца к образцу, загрязнение реагентов и инструментария. Для выявления контаминации в каждой постановке используют отрицательный контроль, проводимый через все стадии пробоподготовки, постановку реакции в двух или трех параллелях, специальные контроли, позволяющие верифицировать результаты.

Причинами ложноотрицательных результатов являются деградация, отсутствие или небольшое количество исследуемой ДНК в пробах или образцах выделенных нуклеиновых кислот; несоблюдение технологии выделения нуклеиновых кислот; неисправность оборудования, наличие ингибиторов ПЦР; несоблюдение технологии внесения образцов ДНК в пробирку на этапе амплификации; несоблюдение технологии внесения ампликонов в гель.

Обоснование целесообразности практического использования метода определения доминирующей микрофлоры в биоматериале из трахеобронхиального дерева при инфекционном обострении хронической обструктивной легочной болезни

Острое обострение хронической обструктивной легочной болезни определяется как внезапное утяжеление и одномоментное нарастание симптомов у пациента, требующее медицинского вмешательства и интенсификации терапии. Диагностика инфекционного характера обострения ХОБЛ проводится в большинстве случаев на основании симптомов пациента. Руководства Global initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD) фокусируются на симптомах, которые включают увеличение одышки, гнойности и/или объема мокроты. Спирометрия не рекомендуется пациентам с инфекционным обострением ХОБЛ. Антибактериальные лекарственные средства (АБЛС) назначаются, как правило, эмпирически. Инфекционные обострения могут быть вызваны активным размножением колонизированных бактерий или инфекцией дыхательных путей новыми штаммами микроорганизмов. Поскольку пациенты с ХОБЛ, вероятно, имеют хроническую бактериальную колонизацию, микробиологические исследования мокроты трудно интерпретировать, если только предшествующие данные культуры недоступны для сравнения. Поэтому существует мнение, что рутинное микробиологическое исследование мокроты неинформативно. Методы высокопроизводительного секвенирования произвели революцию в исследованиях микробиоты легких, что привело к пониманию того, что здоровые легкие не являются стерильными. Несколько исследований микробиоты здоровых лиц и пациентов с ХОБЛ с использованием бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и мокроты были описаны с использованием молекулярных методов. В этих исследованиях использовались образцы, полученные через верхние дыхательные пути, такие как индуцированная мокрота, БАЛ и эндотрахеальный аспират. Многие из этих исследований идентифицировали оральные бактерии в образцах нижних дыхательных путей. Микробиота легких была почти неотличима от микробиоты полости рта, но авторы не смогли определить, были ли их результаты следствием аспирации и загрязнения бронхоскопа во время введения через рот. В дизайне нашего исследования мы используем защищенную щеточную биопсию, исключая контаминацию материала.

Инфекции дыхательных путей являются наиболее распространенной причиной обострений ХОБЛ — 40–80 % случаев. Однако большинство данных получено от амбулаторных пациентов, и в качестве материала для идентификации бактериальной культуры в исследованиях использовалась, как правило, мокрота. Кроме того, существуют географические различия в бактериологическом профиле обострения ХОБЛ. Некоторые исследования коррелировали с нарушением функции легких и бактериальным возбудителем, ответственным за обострение. Кроме того, у госпитализированных пациентов обычно более тяжелые нарушения функции легких, а спектр возбудителей может различаться. Одним из основных препятствий в определении роли бактериального возбудителя в качестве

инфекционного агента обострения ХОБЛ является колонизация дыхательных путей бактериями даже вне обострения. Несмотря на продолжающую дискуссию по этому вопросу имеются многочисленные доказательства того, что обострения ХОБЛ сопровождаются высокой бактериальной нагрузкой.

В связи с этим важно определить характеристики пациентов, которые связаны с конкретной бактериальной инфекцией, разработать конкретные рекомендации по эмпирической антибактериальной терапии. Актуальным является исследование этиологических агентов (бактерий), участвующих в обострении ХОБЛ у госпитализированных пациентов, их соотношения с функцией легких, а также факторов, связанных с выделением патогена и характером антибиотикорезистентности.