

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты  
прав потребителей и благополучия человека**

**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ  
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

**Выявление редких труднокультивируемых форм  
возбудителей воспалительных заболеваний  
органов дыхания с использованием метода ПЦР**

**Методические рекомендации  
МР 4.2.0060—12**

ББК 51.9  
В92

**В92 Выявление редких труднокультивируемых форм возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания с использованием метода ПЦР: Методические рекомендации.** — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012. — 15 с.

1. Разработаны Федеральным бюджетным учреждением науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И. Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Е. И. Ефимов, В. Н. Мазепа, Н. Ф. Бруснигина, О. М. Черневская, К. А. Орлова, М. А. Махова, Е. В. Сперанская, Н. Н. Кленина, Л. Е. Скобло).

Разработаны в рамках реализации отраслевой научно-исследовательской программы «Научные аспекты обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в Российской Федерации на 2006—2010 гг.».

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 9 апреля 2012 г.

3. Введены в действие с момента утверждения.

**ББК 51.9**

## Содержание

Термины и сокращения.....	3
Введение.....	4
1. Область применения.....	6
2. Нормативные ссылки.....	6
3. Сущность метода.....	7
4. Требования к помещениям и технике безопасности.....	7
5. Аппаратура, материалы и реактивы.....	7
6. Подготовка материала для исследований.....	8
7. Порядок проведения исследования.....	9
7.1. Выделение ДНК из клинического материала.....	9
7.2. Амплификация ДНК (ПЦР).....	9
7.3. Выявление продукта ПЦР.....	10
8. Интерпретация результатов.....	10
9. Эффективность использования метода.....	11
Список использованной литературы.....	14

## Термины и сокращения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

УФ-свет – ультрафиолетовый свет

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы  
по надзору в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека,  
Главный государственный санитарный врач  
Российской Федерации

Г. Г. Онищенко

9 апреля 2012 г.

Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ  
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Выявление редких труднокультивируемых форм  
возбудителей воспалительных заболеваний органов  
дыхания с использованием метода ПЦР**

Методические рекомендации  
МР 4.2.0060—12

---

**Введение**

Воспалительные заболевания органов дыхания инфекционно-аллергической природы (бронхиты, пневмонии, бронхиальная астма) – одна из актуальных проблем современного здравоохранения. Они являются причиной большинства госпитализаций, на них приходится большое количество смертельных исходов. [1, 2, 3].

В настоящее время все большее значение в развитии заболеваний респираторного тракта придается так называемым «атипичным» патогенам – *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, которые специфически взаимодействуют с эпителиальными клетками дыхательных путей, нарушая мукоцилиарный клиренс, оказывают иммуносупрессивное действие [4, 5, 6]. Кроме того, они устойчивы к бета-лактамам антибиотикам, наиболее часто применяемым в клинической практике. Все эти свойства позволяют им не только длительно сохраняться в организме в виде моноинфекции, но и способствуют формированию смешанной (бактериальной-бактериальной, бактериальной-вирусной) инфекции, подерживающей постоянный воспалительный процесс на слизистых респираторного тракта.

Несмотря на то, что частота обнаружения *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Cytomegalovirus* существенно ниже *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, выявление их при диагностике заболеваний органов дыхания крайне важно, так как при их обнаружении проводится специфическое, отличающееся от традиционного, лечение.

При проведении лабораторных исследований, как правило, используют комплекс методов – бактериологических, культуральных, иммунологических, серологических [7, 8, 9]. Большинство атипичных возбудителей, которые характеризуются высокой антигенной изменчивостью, данными методами детектируются недостаточно успешно.

При этиологической диагностике инфекционных заболеваний органов дыхания в большинстве исследований (до 90 %) не выявляется инфекционный агент. В связи с этим разработка эффективных и экономически целесообразных способов детекции этих инфекционных агентов приобретает особую актуальность.

В настоящих методических рекомендациях предлагается проводить обнаружение редких форм возбудителей методом ПЦР в пуле ДНК, выделенной из смеси субстратов (мокроты, мазков со слизистой задней стенки глотки и бронхоальвеолярной жидкости) от пяти пациентов, что сокращает материальные затраты, снижает себестоимость исследования, повышает эффективность выявления инфекционных агентов.

Предложенный алгоритм исследования позволяет провести обследование больных с острыми и хроническими заболеваниями органов дыхания одновременно на большинство редких труднокультивируемых инфекционных агентов современными молекулярно-генетическими методами. В настоящее время в отечественной медицинской практике подобные исследования не регламентированы соответствующими документами, зачастую они проводятся в недостаточном объеме.

В странах Европы и США метод ПЦР широко используется для выявления вирусных и бактериальных возбудителей заболеваний респираторного тракта, что увеличивает эффективность определения этиологического агента [10, 11, 12].

Исследование пула смеси субстратов одновременно на комплекс инфекционных агентов снижает себестоимость анализа в 3—4 раза и увеличивает вероятность выявления возбудителя. Таким образом, предложенный алгоритм дает возможность проводить экономически оправданный скрининг и мониторинг больных с разными типами патологии респираторного тракта на наличие редких, труднокультивируемых форм возбудителей.

## 1. Область применения

1.1. Настоящие медицинские рекомендации (далее — МР) применяются при проведении исследований с целью выявления этиологических агентов, вызывающих воспалительные и инфекционно-аллергические заболевания органов дыхания.

1.2. В настоящих МР представлен первичный (скрининговый) способ выявления труднокультивируемых и редко встречающихся бактериальных и вирусных возбудителей заболеваний органов дыхания у детей и взрослых. Определен перечень редких микроорганизмов, способных вызывать целый ряд инфекционных заболеваний верхних и нижних дыхательных путей. Разработан оптимизированный алгоритм детекции этих возбудителей с использованием метода ПЦР-минибулов, позволяющий снизить себестоимость исследования в 3—4 раза.

1.3. Методические рекомендации предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также для инфекционистов, аллергологов, пульмонологов, терапевтов, педиатров медицинских организаций Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

## 2. Нормативные ссылки

1. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней».

2. СП 1.3.2518—09 «Дополнения и изменения 1 к СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней».

3. СанПиН 2.1.7.2527—09 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

4. МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

5. МУ 4.2.2039—05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

6. МУ 3.5.5.1034—01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп при работе методом ПЦР».

### 3. Сущность метода

Сущность предлагаемого метода заключается в том, что с целью повышения эффективности выявления инфекционных агентов и снижения себестоимости исследования для ПЦР-детекции редких видов возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания формируют минипул из ДНК, выделенной из смеси субстратов (мокроты, бронхоальвеолярного лаважа, мазка со слизистой задней стенки глотки) от пяти (четырёх, трёх) человек.

### 4. Требования к помещениям и технике безопасности

4.1. Планировка помещений лаборатории и организация работы по проведению ПЦР-исследований осуществляются в соответствии с МУ 1.3.2569—09.

4.2. Для работы с возбудителями респираторных заболеваний, которые относятся к III—IV группам патогенности, оформляется лицензия на право работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности.

4.3. При контакте с исследуемым материалом необходимо соблюдать меры предосторожности, изложенные в СП 1.3.2322—08, СП 1.3.2518—09.

4.4. Утилизацию исходных субстратов и отходов ПЦР-исследования проводят в соответствии с СанПиН 2.1.7.2527—09, МУ 3.5.5.1034—01, МУ 1.3.2569—09.

### 5. Аппаратура, материалы и реактивы

#### 5.1. Оборудование, необходимое для проведения исследования

Стандартное оборудование для ПЦР-лаборатории отечественного и зарубежного производства, имеющее номера Государственной регистрации в Российской Федерации [13].

#### 5.2. Наборы реагентов для обработки клинического материала

Комплекты реагентов отечественного производства для выделения ДНК из крови, ликвора, мокроты, биоптатов и др., основанные на лизисе клеток детергентами и сорбции нуклеиновых кислот типа «ДНК-Сорб В» (или эквивалент) и «Проба ГС» (или эквивалент), имеющие номера Государственной регистрации в Российской Федерации.

#### 5.3. Наборы реагентов для постановки ПЦР

ПЦР-тест-системы отечественного производства типа «АмплиСенс» (или эквивалент) и GenePak DNA PCR test, для вы-

явления *Human cytomegalovirus*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, имеющие номера Государственной регистрации в Российской Федерации.

Предпочтение отдается системам, имеющим внутренний контроль ингибирования ПЦР и систему антиконтаминационной модификации ампликонов, которые уменьшают вероятность получения ложноотрицательных и ложноположительных результатов.

#### *5.4. Набор реагентов для проведения электрофореза в агарозе*

Комплекты реагентов отечественного производства типа ЭФ-200, комплект №1 для электрофоретической детекции, содержащие агарозу для электрофореза, компоненты буфера для электрофореза, интеркалирующий агент-краситель.

#### *5.5. Стандартные дезинфицирующие растворы*

Для обеспечения санитарно-эпидемиологического режима в лаборатории при работе с возбудителями III—IV групп патогенности и для предотвращения контаминации продуктами амплификации используются стандартные дезинфицирующие растворы в соответствии с СП 1.3.2322—08, СП 1.3.2518—09 и МУ 3.5.5.1034—01 [14, 16].

## **6. Подготовка материала для исследований**

При проведении анализа может использоваться следующий клинический материал: мокрота, промывные воды бронхов или бронхоальвеолярный лаваж, мазки со слизистой задней стенки глотки.

Отбор, транспортирование и хранение клинического материала проводится в соответствии с МУ 4.2.2039—05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории» (17).

Отбор материала осуществляется в процедурных кабинетах поликлиник, клинических и инфекционных стационарах.

Отбор мазков со слизистой задней стенки глотки проводят с помощью одноразовых ватных тампонов маленького размера, смоченных 0,9 %-м раствором хлорида натрия. Тампон помещают в 1,5 мл пробирку типа «Эппендорф», содержащую 200 мкл 0,9 %-го раствора хлорида натрия.

Мокроту отбирают в специальные одноразовые стерильные контейнеры с широким горлом с завинчивающейся крышкой, в количестве не более 2 мл.

Бронхоальвеолярную жидкость собирают в ходе бронхоскопии в стерильные одноразовые контейнеры в количестве не более 2 мл.



Отобранный клинический материал доставляют в тот же день в течение 3—4 ч в лабораторию.

Пробы следует хранить в холодильнике при температуре  $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 16 ч и/или в морозильной камере при температуре  $-(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 2 недель. Необходимо сохранять отдельные субстраты от каждого пациента до завершения исследования.

Следует отметить, что недопустим контакт между контейнерами с субстратами разных пациентов и между контейнерами с различными субстратами от одного пациента.

## **7. Порядок проведения исследований**

### ***7.1. Выделение ДНК из клинического материала***

Проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки клинического материала.

На первом этапе ДНК выделяют из смеси биологических субстратов от одного пациента. Исследованию подвергают смесь мокроты, мазков со слизистой задней стенки глотки и бронхоальвеолярной жидкости (лаважа). При отсутствии возможности отбора бронхоальвеолярной жидкости исследуют смесь мокроты и мазков со слизистой задней стенки глотки. Если у больного нет мокроты, анализируют смесь слюны и мазков со слизистой задней стенки глотки.

Субстраты смешивают в равных количествах таким образом, чтобы объем смеси составил 100 мкл, что является рекомендуемым объемом материала при выделении ДНК с использованием набора реагентов типа «ДНК-Сорб В» (или эквивалент).

В соответствии с количеством обследуемых пациентов готовят необходимое количество одноразовых пробирок (включая отрицательный контроль выделения). Пробирки маркируют.

Выделение нуклеиновых кислот из смеси клинических материалов проводят в соответствии с наставлением по применению выбранного набора реагентов для обработки клинического материала.

Очищенную ДНК можно хранить в течение недели при температуре от 2 до 8  $^\circ\text{C}$  и в течение 1 года при температуре не выше  $-16 ^\circ\text{C}$ . Препараты ДНК, выделенные из смеси субстратов, сохраняют до завершения исследования.

### ***7.2. Амплификация ДНК (ПЦР)***

Проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для раскапывания реагентов и проведения ПЦР.

Для ПЦР-детекции редких видов возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания формируют минипул из ДНК, выделенной из субстратов от пяти (четырёх, трёх) человек. Препараты ДНК смешивают в равных объемах таким образом, чтобы получился объем, который указан в наставлении к ПЦР-тест-системам, как объем исследуемого образца, вносимый в реакционную смесь. Например, если объем исследуемого образца 10 мкл, то от 5 человек берут по 2 мкл раствора ДНК; от 4 – по 2,5 мкл; от 3 – 3,3 мкл.

ПЦР-детекция *Cytomegalovirus*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis* проводится тест-системами типа «АмплиСенс» или GenePak DNA PCR test (или эквивалент) в соответствии с наставлениями по применению.

### 7.3. Выявление продукта ПЦР

Проводится в ЗОНЕ 3 – помещении для детекции продуктов амплификации.

Продукт ПЦР – это фрагмент ДНК, имеющий определенный размер, одним из наиболее доступных способов его обнаружения является электрофоретическое разделение реакционной смеси в агарозном геле.

Для проведения электрофореза используют наборы реактивов типа ЭФ-200 или комплект № 1 для электрофоретической детекции. Электрофорез проводят в соответствии с инструкцией по применению выбранного набора.

Для учета результатов электрофореза гель помещают на трансиллюминатор. В УФ-свете видны оранжевые полосы, соответствующие фрагментам ДНК.

Изображение геля фиксируют в памяти персонального компьютера с помощью цифровых систем для обработки видеoinформации.

## 8. Интерпретация результатов

Положительными считаются образцы, содержащие полосы, идущие в геле на том же уровне, что и полоса в положительном контроле.

В случае отсутствия ДНК инфекционных агентов в минипулах исследование на этом заканчивается.

При выявлении в минипуле ДНК патогенов (как правило, одного из 5), все пробы, входящие в пул проверяются на данный(е) возбудитель(и) для установления конкретного инфицированного

пациента. ПЦР проводится так же, как изложено в п. 7.2. настоящих МР.

### 9. Эффективность использования метода

Оценка эффективности метода проводилась на базе лаборатории молекулярно-генетических методов надзора за инфекционными заболеваниями Нижегородского НИИЭМ им. академика И. Н. Блохиной и городских детских больниц № 1, 27, 39, Кстовской ЦРБ, Нижегородского военного госпиталя. Обследовано более 1 000 больных с различными типами патологии органов дыхания, включающими: бронхит – 347 чел., внебольничную пневмонию – 424 чел., бронхиальную астму – 180 чел., ОРЗ – 220 чел.

Результаты обнаружения труднокультивируемых форм инфекционных агентов при различных заболеваниях органов дыхания представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

**Частота выявления атипичных инфекционных агентов при первичном обследовании детей и взрослых с бронхолегочной патологией**

Инфекционные агенты	Частота выявления, %	
	взрослые (n = 640)	дети (n = 531)
<i>Chlamydomphila psittaci</i>	0	5,0
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	4,3	0,2
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	9,5	13,8
<i>Legionella pneumophila</i>	0,7	0
<i>Cytomegalovirus</i>	5,4	42,4
<i>Herpes simplex I/II</i>	11,3	6,7
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2,5	0

На основании данных о частоте выявления инфекционных агентов, представленных в табл. 1 и 2, был определен спектр возбудителей, рекомендуемых для выявления методом мнипулов. Спектры включают инфекционные агенты, частота выявления которых, как правило, не превышает 5 %: *Cytomegalovirus*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Mo-*

Таблица 2

**Частота выявления атипичных инфекционных агентов при различных заболеваниях органов дыхания у детей и взрослых**

Инфекционные агенты	Частота выявления, %					
	дети (n = 531)				взрослые (n = 640)	
	Астма	Бронхит	Пневмония	ОРЗ/ОРВИ	Пневмония	Бронхит
<i>C. psittaci</i>	1,6	6,3	5,7	6,3	0	0
<i>C. pneumoniae</i>	0	0,6	0	0	4,3	0
<i>M. pneumoniae</i>	10,7	10,4	23,5	10,5	12,6	6,3
<i>L. pneumophila</i>	0	0	0	0	0,7	0
<i>Cytomegalovirus</i>	39,3	53,1	31,9	45,2	4,5	6,3
<i>H. simplex I/II</i>	3,8	12,5	4,3	6,3	16,2	6,3
<i>M. catarrhalis</i>	0	0	0	0	2,5	0

*raxella catarrhalis* – у взрослых; *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis* – у детей.

С целью проверки чувствительности и эффективности метода минипулов были проведены сравнительные исследования 50 образцов с известным содержанием инфекционных агентов. Использовали метод ПЦР-минипулов и индивидуальное ПЦР-исследование всех образцов. Пулы были составлены таким образом, чтобы в каждом присутствовал только один образец, содержащий инфекционный агент (для получения максимального разведения). Результаты, полученные методом минипулов и индивидуальным анализом образцов, совпали в 100 % случаев. Показано, что разведение при пулировании 5 образцов не оказывает значительного влияния на эффективность выявления инфекционного агента.

Чувствительность тест систем типа «Ампли Сенс» и «GenePak DNA PCR test» составляет не менее  $10^3-5 \times 10^3$  бактериальных клеток или ДНК-содержащих вирусных частиц на миллилитр клинического образца. Тест-системы высокоспецифичны, неспецифического взаимодействия праймеров не наблюдалось.

Исследование смеси нескольких клинических субстратов на весь спектр инфекционных агентов уменьшает вероятность ложно-отрицательных результатов на 25—30 % по сравнению с анализом только одного субстрата. Анализ смеси субстратов экономичнее в 2—3 раза и занимает в 1,5—2,0 раза меньше времени, чем развернутый анализ отдельных субстратов на все инфекционные агенты. Анализ пула смесей от 5 пациентов дополнительно снижает себестоимость исследования в 3—4 раза. Кроме этого следует отметить, что ни один из классических методов лабораторной диагностики, кроме ПЦР, не позволяет одновременно выявлять весь спектр труднокультивируемых инфекционных агентов, на который предложено обследовать детей и взрослых. Классическими микробиологическими методами данные исследования на практике не проводятся. В связи с этим рекомендовано использовать данную медицинскую технологию для первичного обследования взрослых и детей с воспалительными заболеваниями органов дыхания на инфицированность редкими формами инфекционных агентов.

В лаборатории молекулярно-генетических методов надзора за инфекционными заболеваниями Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И. Н. Блохиной было проведено обследование 100 пациентов методом минипулов на наличие пяти инфекционных агентов: *Cytomegalovirus*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*. Сформировано 20 минипулов по 5 человек, у каждого из пациентов анализировалась смесь из трех субстратов.

В 13 пулах инфекционных агентов не было выявлено. В пяти пулах выявлено по 1 возбудителю (в них у одного из пяти пациентов обнаружены *Chlamydomphila pneumoniae*). В двух пулах выявлено по 2 инфекционных агента (в каждом из них у одного из пяти пациентов обнаружены *Cytomegalovirus* и *Chlamydomphila pneumoniae*).

Для получения этих результатов при использовании метода минипулов» потребовалось 145 ПЦР исследований. При проведении развернутого исследования всех субстратов от каждого больного на 5 инфекционных агентов потребовалось бы проведение 1 500 ПЦР исследований; при анализе смеси субстратов без пулирования — 500 ПЦР исследований. Следовательно, применение метода «двойных минипулов» позволяет снизить стоимость исследования в 3,4—10,3 раз.

Предложенный метод при использовании в комплексе с классическими клиничко-лабораторными исследованиями позволяет повысить эффективность и достоверность диагностических исследований, а также создать алгоритм ведения больных воспалительными заболеваниями органов дыхания инфекционной природы.

Этиологическая диагностика воспалительных заболеваний органов дыхания с использованием предлагаемого метода позволяет своевременно проводить эффективную антибактериальную и иммуномодулирующую терапию, что сокращает сроки пребывания больного в стационаре в среднем на 1 неделю, уменьшает сроки реабилитации и снижает риск возникновения осложнений.

### Список использованной литературы

1. Чучалин А. Г. Пневмония / А. Г. Чучалин, А. И. Синопальников, Л. С. Страчунский. М.: МИА. 2006. 464 с.
2. Барлет Джон Дж. Инфекции дыхательных путей. Пер. с англ. /Джон Дж. Барлет. М.: Бином. 2000. 192 с.
3. Тартаковский И. С. Современные подходы к диагностике атипичных пневмоний / И. С. Тартаковский //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. Т. 2. № 6. С. 60—68.
4. Егоров А. М. Хламидии: Молекулярная организация клетки и некоторые особенности патогенеза инфекций / А. М. Егоров, Ю. О. Сазыкин //Антибиотики и химиотерапия. 2000. Т. 45. № 4. С. 3—5.
5. Белоцерковская Ю. Г. Роль *Chlamydomphila pneumoniae* в бронхолегочной патологии человека / Ю. Г. Белоцерковская, А. И. Синопальников //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2008. Т. 10. № 1. С. 15—24.
6. Синопальников А. И. Тяжелая внебольничная пневмония: этиологическая структура /А. И. Синопальников, О. В. Фесенко, Ю. Г. Тихонов, В. К. Дуганов //Антибиотики и химиотерапия. 2001. Т. 46, № 6. С. 6—11.
7. Kuroki H. Characterization of children with *Mycoplasma pneumoniae* infection detected by rapid polymerase chain reaction technique / H. Kuroki, M. Morozumi, N. Chiba, K. Ubukata // J. Infect. Chemother. 2004. V. 10. № 1. P. 65—67.
8. Фризе К. Инфекционные заболевания беременных и новорожденных / Пер. с нем. К. Фризе, В. Кахель. М.: Медицина, 2003. 424 с.
9. Чучалин А. Г. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике / А. Г. Чучалин, А. И. Синопальников, С. В. Яковлев, Л. С. Страчунский. М. 2003. 30 с.
10. Gonzales R. Uncomplicated acute bronchitis / R. Gonzales, M. A. Sande // Ann. Intern. Med. 2000. V. 133. P. 981—991.
11. Schneeberger P. M. Diagnosis of atypical pathogens in patients hospitalized with community-acquired respiratory infection /

P. M. Schneeberger, J. W. Dorigo-Zetsma, A. van der Zee et al. // *Scand. J. Infect. Dis.* 2004. V. 36. № 4. P. 269—273.

12. Ursi D. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples by real-time PCR using an inhibition control / D. Ursi, K. Dirven, K. Loens et al. // *J. Microbiol. Methods.* 2003. V. 55. P. 149—153.

13. МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

14. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней».

15. СанПиН 2.1.7.2527—09 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

16. МУ 3.5.5.1034—01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп при работе методом ПЦР».

17. МУ 4.2.2039—05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».