

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

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:

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

к.м.н., доцент Д.Ю. Рузанов, к.м.н., доцент Е.В. Воропаев, О.В. Осипкина,
д.б.н., доцент О.Ю. Баранов, А.А. Зятков, В.А. Воробей, С.В. Миронова,
к.м.н, доцент 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 (далее – ХОБЛ). Метод включает применение защищенной щеточной браш-биопсии для получения биологического материала из нижних дыхательных путей при инфекционном обострении ХОБЛ и проведение молекулярно-генетического исследования с целью определения видового состава микробных сообществ путем анализа размеров терминальных рестрикционных фрагментов области гена 16S рибосомальной РНК бактерий (рРНК).

1. Область применения

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 с целью лечения инфекционного обострения ХОБЛ.

2. 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).

3. Противопоказания к применению:

- непереносимость препаратов, применяемых для местной анестезии при фибробронхоскопии;
- инфаркт миокарда, перенесенный менее 6 мес. назад;
- острый инсульт;
- нарушение сердечного ритма (выше III степени);
- легочно-сердечная и сердечно-сосудистая недостаточность III степени;
- стеноз гортани и (или) трахеи II-III степени;
- нервно-психические заболевания (эпилепсия, состояние после черепно-мозговой травмы, шизофрения);
- болевой синдром в брюшной полости;
- крайне тяжелое состояние больного, когда уточнение диагноза уже не может повлиять на лечебную тактику.

4. Перечень необходимых изделий медицинской техники и изделий медицинского назначения

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

Проведение защищенной щеточной браш-биопсии 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 (10000–15000×g), диапазон рабочих температур от 0 до +25 °С
Твердотельный термостат (диапазон рабочих температур -10-+99 °С)
Микроцентрифуга-вортекс
Насос с колбой-ловушкой
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл, 10-100 мкл; 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
Проведение ПЦР-реакции
Амплификатор (термоциклер)
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга-вортекс
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур -10 – + 99 °С
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С

Проведение фрагментного анализа областей гена 16S рРНК
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10000–15000×g), диапазон рабочих температур от 0 до +25 °С
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур -10 – + 99 °С
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл, 10-100 мкл; 100-1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
Система для проведения 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 проведения горизонтального электрофореза в агарозном геле, для проведения 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.

5. Технология осуществления 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 проведения видовой идентификации микроорганизмов, в том числе 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 пациентов.

Метод включает следующие этапы.

Взятие и транспортировка биологического материала

- Подготовка пациента к бронхоскопии, местная анестезия, обработка аппарата не имеет особенностей.
- При прохождении аппаратом через верхние дыхательные пути и интубации трахеи вакуумный насос должен быть выключен для исключения контаминации щёточного катетера при продвижении через манипуляционный канал бронхоскопа.
- При наличии локального воспалительного процесса (bronхоэктазия, пневмония, гнойная деструкция) биопсия берётся 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 проводятся 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.

– 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 пробями плотно закрывают, маркируют и транспортируют в лабораторию.

– В связи с определённым низким риском легочного кровотечения и травматического пневмоторакса пациент должен находиться под наблюдением 24 часа после фибробронхоскопии.

Экстракция ДНК, проведение ПЦР и электрофоретической детекции

Выделение ДНК можно проводить с использованием готовых коммерческих наборов, позволяющих выделять ДНК из небольшого

количества образца. Для определения качественных и количественных характеристик ДНК проводят 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-CCGTCAATTCSTTTRAGTTT. 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°C. Для предварительной детекции продуктов ПЦР проводят 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.

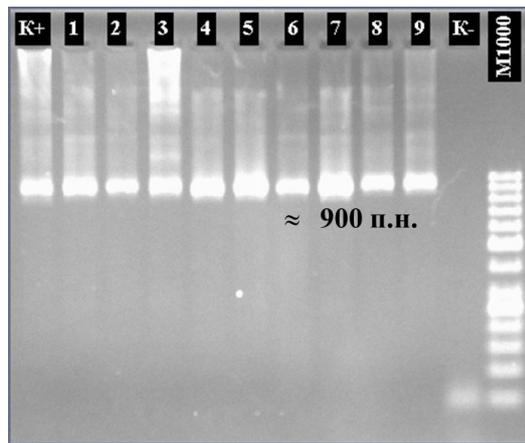


Рисунок 1 – Электрофоретическая детекция амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК

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, проводят 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, NhaI, 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

Электрофоретический анализ высокой степени разрешения проводят с использованием генетического анализатора и специализированных программных пакетов, предназначенных 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* (ATCC 25923).

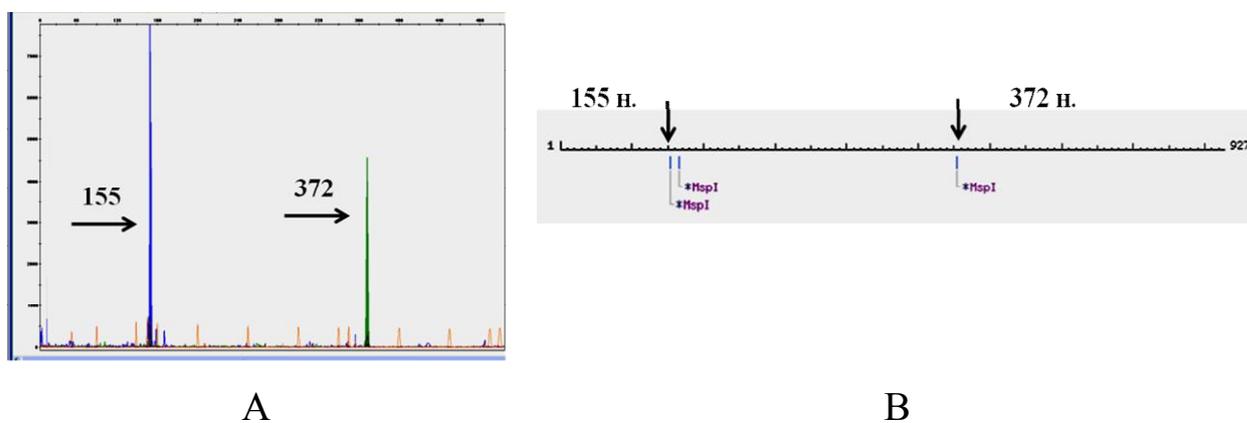


Рисунок 2 – Электрофоретический спектр терминальных рестрикционных фрагментов (А) и рестрикционная карта фрагмента гена 16S рРНК контрольного образца *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (В)

Как видно из рисунка 2, на электрофореграмме присутствуют два пика, соответствующих терминальным рестрикционным фрагментам размером 155 и 372 нуклеотидных оснований, получаемых при фрагментации ампликона. Полученные результаты соответствуют данным рестрикционной 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	GAGAATTCCTGTCTTTTCAA	

Программа амплификации: денатурация 1 цикл - 95°C, 5 мин; 35 циклов (95°C - 60 с, 55°C - 60с, 72°C – 60 с); финальная элонгация 1 цикл 72°C – 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	CTGGGTCGAAAGGTGGTTGTTATC	232
(Oac)-обратный	GCGGCTGGTGCGGCTGAGTC	

Программа амплификации: денатурация 1 цикл - 95°C, 3 мин; 35 циклов (95°C - 60 с, 63°C - 30с, 72°C – 60 с); финальная элонгация 1 цикл 72°C – 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	GGCTGТАCTACAACGATGAC	931
TyrB -обратный	TTGAGCAGGТААТССACTTTG	

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

Таблица 4 – Структура праймеров, используемых для выявления фрагмента гена β-субъединицы бактериальной РНК-полимеразы (*RpoB*) *Acinetobacter baumannii*.

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента, п.н.
<i>RpoB</i> -прямой	САТАААСТGAGАТААСТGGCTTGAACC	529
<i>RpoB</i> -обратный	CGTCGACTTCACSTTTACCGTTAC	

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

Таблица 5 – Структура праймеров, используемых для выявления фрагмента гена термонуклеазы (*Nuc*) *Staphylococcus aureus*.

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента, п.н.
<i>Nuc</i> -прямой	GCGATTGATGGTGATACGGTT	267
<i>Nuc</i> -обратный	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	

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

Таблица 6 – 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	TGCGCGTTGTTCTTGTTGGTG	

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

6. Заключение

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 проводят оптимизацию этиопатогенетической терапии инфекционного обострения ХОБЛ, особенно у иммунокомпрометированных пациентов, что способствует профилактике развития различных дисбактериозов, возникающих на фоне антибиотикотерапии.

7. Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

Проведение молекулярно-генетических исследований 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 диагностике и, соответственно, неправильно подобранной терапии, что в конечном итоге может нанести вред пациенту. Сотрудники, проводящие исследования, 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, использование специальных контролей, позволяющих верифицировать результаты.

Причинами появления 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, а также 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 (далее – ХОБЛ) 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 объёма мокроты [1]. Спирометрия не рекомендуется пациентам с инфекционным обострением ХОБЛ. Назначение антибактериальных лекарственных средств (АБЛС) проводится, как правило, эмпирически [2, 3, 4]. 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 не информативно [5]. Методы высокопроизводительного секвенирования произвели революцию в исследованиях микробиоты легких, что привело к пониманию того, что здоровые легкие не являются стерильными. Несколько исследований микробиоты здоровых и

пациентов с ХОБЛ с использованием бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и мокроты были описаны с использованием молекулярных методов [6]. В этих исследованиях использовались образцы, полученные через верхние дыхательные пути, такие как индуцированная мокрота, бронхоальвеолярный лаваж 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, исключаящую контаминацию материала.

Инфекции дыхательных путей являются наиболее распространенной причиной обострений ХОБЛ, связанной с 40-80% случаев [7]. Однако большинство данных получены от амбулаторных пациентов, и для получения материала для 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 [8]. Кроме того, у госпитализированных пациентов обычно более тяжелые нарушения функции легких, а спектр возбудителей может отличаться. Одним из основных препятствий в определении роли бактериального возбудителя в качестве возбудителя инфекционного обострения ХОБЛ является колонизация дыхательных путей бактериями даже в отсутствие обострения. Несмотря на продолжающиеся дебаты по этому вопросу, имеются многочисленные доказательства того, что обострения ХОБЛ сопровождаются высокой бактериальной нагрузкой [7].

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 связи с функцией легких, факторов, связанных с выделением патогена и характером антибиотикорезистентности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:

1 Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2017 // [Electronic resource]. – Mode of access: – <http://goldcopd.org/>. – Data of access: 28.05.2018.

2 Авдеев С.Н. Современные подходы к антибактериальной терапии обострений хронической обструктивной болезни легких. Пульмонология. 2012; 3: 109–114.

3 Jin-Xiang Wang, Shu-Ming Zhang, Xiao-Hui Li, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease with low serum procalcitonin values do not benefit from antibiotic treatment: a prospective randomized controlled trial. International Journal of Infectious Diseases. 2016; 48: 40-45.

4 Lin, C., Pang, Q. Meta-analysis and systematic review of procalcitonin-guided treatment in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. The Clinical Respiratory Journal. 2016. DOI:10.1111/crj.12519.

5 Corti C, Fally M, Fabricius-Bjerre A, et al. Point-of-care procalcitonin test to reduce antibiotic exposure in patients hospitalized with

acute exacerbation of COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2016; 11: 1381-1389.

6 Pavord ID, Jones PW, Burgel P-R, Rabe KF. Exacerbations of COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2016; 11 (Spec Iss): 21-30.

7 Monsó E, Ruiz J, Rosell A, et al. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 152: 1316–20.

8 Miravittles M, Espinosa C, Fernández-Laso E, et al. Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. *Study Group of Bacterial Infection in COPD*. *Chest*. 1999;116: 40–6.