



СВФУ

СЕВЕРО-ВОСТОЧНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.К. АММОСОВА

Особенности микробиологической диагностики инфекций нижних дыхательных путей

АХРЕМЕНКО ЯНА АЛЕКСАНДРОВНА

К.М.Н., ДОЦЕНТ, ЗАВ. КУРСОМ

МИКРОБИОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ МИ СВФУ

Учебно-научная микробиологическая лаборатория клиники ми свфу



Клинические исследования

Научно-исследовательская работа

Учебная работа (студенты,
ординаторы, слушатели циклов)



Направления научных исследований

Изучение микробного фенотипа и колонизационной резистентности жителей Севера, закономерностей становления и механизмов нарушения при патологических состояниях, разработка адекватных методов коррекции;

Изучение спектра возбудителей микробных заболеваний человека в условиях Севера, их чувствительности и механизмов устойчивости к антимикробным препаратам, в т.ч. на молекулярно-генетическом уровне;

Изучение антимикробной и пробиотической активности препаратов и БАД, разрабатываемых на основе местного природного сырья; разработка инновационных пробиотических продуктов;

Изучение микрофлоры ископаемых животных в рамках Международной программы исследования Малоляховского мамонта





Оборудование лаборатории



Введение

На сегодня нет единой классификации болезней органов дыхания.

Существующие подходы основаны на международных принципах деления бронхолегочных заболеваний с учетом следующих их особенностей: - клинического течения; - этиологии; - патогенеза; - морфологических и функциональных изменений; - преимущественной локализации процесса и ряда других признаков.

Существующие классификации

По клиническому течению заболевания системы внешнего дыхания, в том числе и воспалительного характера, могут быть *острыми* или *хроническими*.

По преимущественному поражению отделов системы дыхания различают расстройства *воздухопроводящих путей* (бронхит, бронхиальная астма, бронхостенозы), либо *респираторных структур легких* (альвеолиты, пневмония, пневмосклероз).

По этиологии заболевания органов системы дыхания могут вызываться патогенными факторами *эндо- и экзогенного* происхождения, которые могут *первично поражать* бронхолегочный аппарата (вызывая трахеиты, бронхиты, пневмонии) или *вторично* поражать его

ИНФЕКЦИИ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

ХОБЛ

ПНЕВМОНИЯ

АБСЦЕСС ЛЕГКОГО
ГНОЙНЫЙ ПЛЕВРИТ

Пневмонии – группа различных по этиологии, патогенезу, морфологической характеристике острых инфекционных (преимущественно бактериальных) заболеваний, характеризующихся очаговым поражением респираторных отделов легких с обязательным наличием внутриальвеолярной экссудации

Пневмония - воспаление лёгких



КР

Внебольничная пневмония 2018

Наиболее важный с клинической точки зрения принцип предусматривает подразделение пневмонии на внебольничную (ВП) и нозокомиальную (НП).

Внебольничной считают пневмонию, развившуюся вне стационара, либо диагностированную в первые 48 ч с момента госпитализации

Этиология ВП

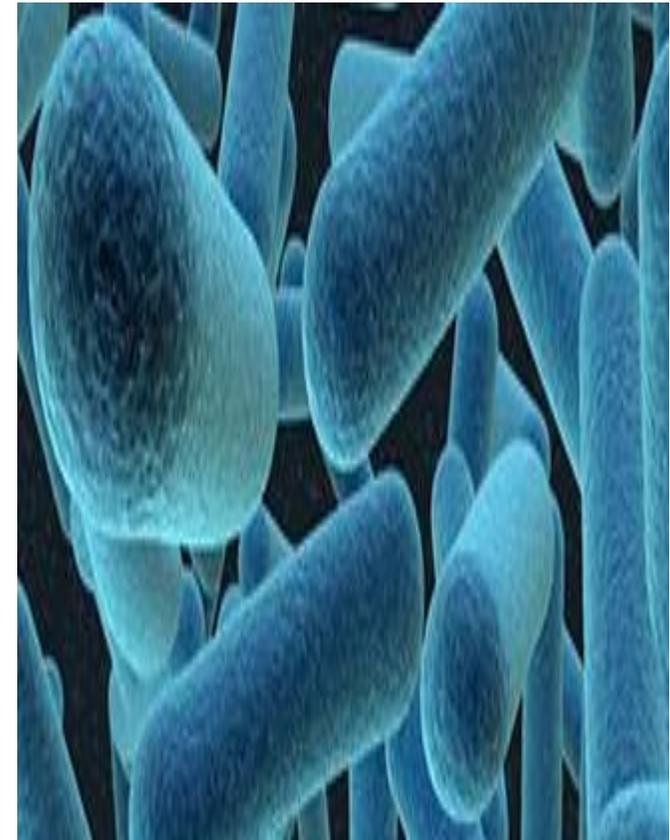
Перечень потенциальных возбудителей ВП включает более 100 микроорганизмов (бактерии, вирусы, грибы, простейшие). Однако большинство случаев заболевания ассоциируется с относительно небольшим кругом патогенов

По классификации ВОЗ все возбудители ИДП делятся на:

1. Патогены высокого уровня приоритетности - *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*.

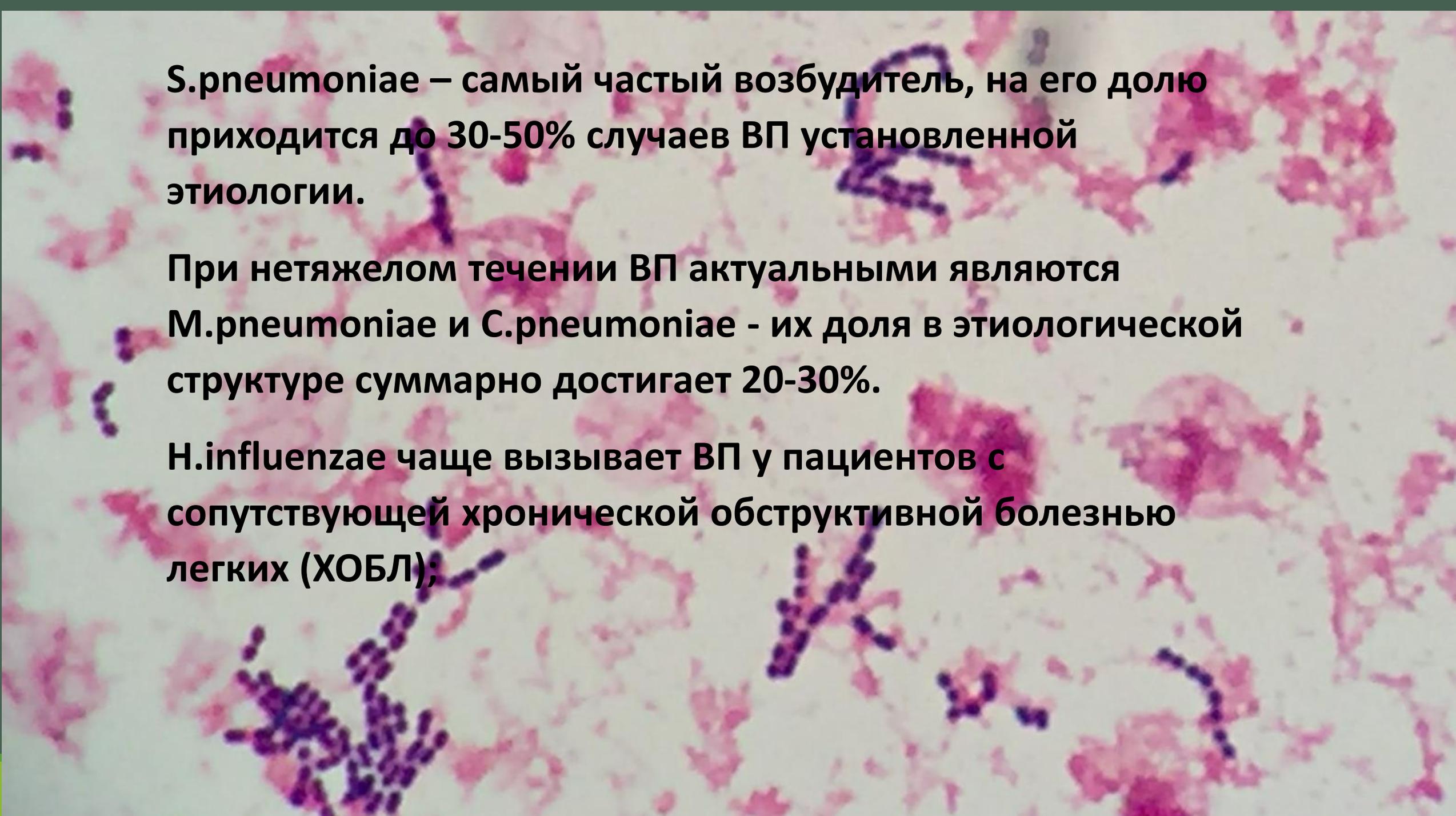
2. Среднего уровня - *Candida albicans*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, другие энтеробактерии.

3. Низкого уровня - *Mycoplasma pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia spp.*, *Legionella pneumophila* и ряд других микроорганизмов.



Структура возбудителей ВП (частота выделения, %)

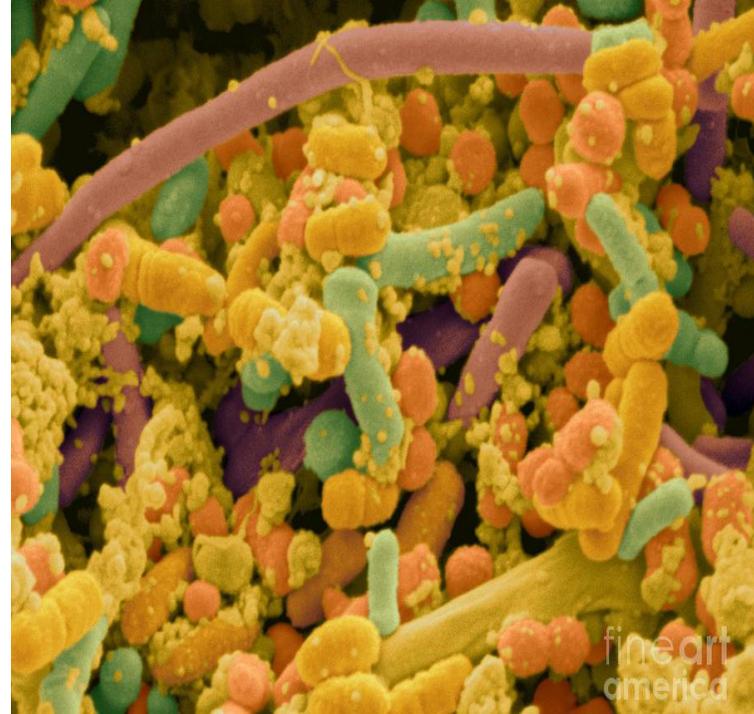
	Амбулаторные	Стационарные	ОРИТ
<i>S. pneumoniae</i>	38	27	28
<i>C. pneumoniae</i>	21	11	4
Респир вирусы	17	12	3
<i>H. influenzae</i>	13	6	7
<i>M. pneumoniae</i>	8	5	2
<i>S. aureus</i>	1,5	3	9
Enterobacterales	0	4	9
<i>P. aeruginosa</i>	1	3	4
Не установлен	50	41	45



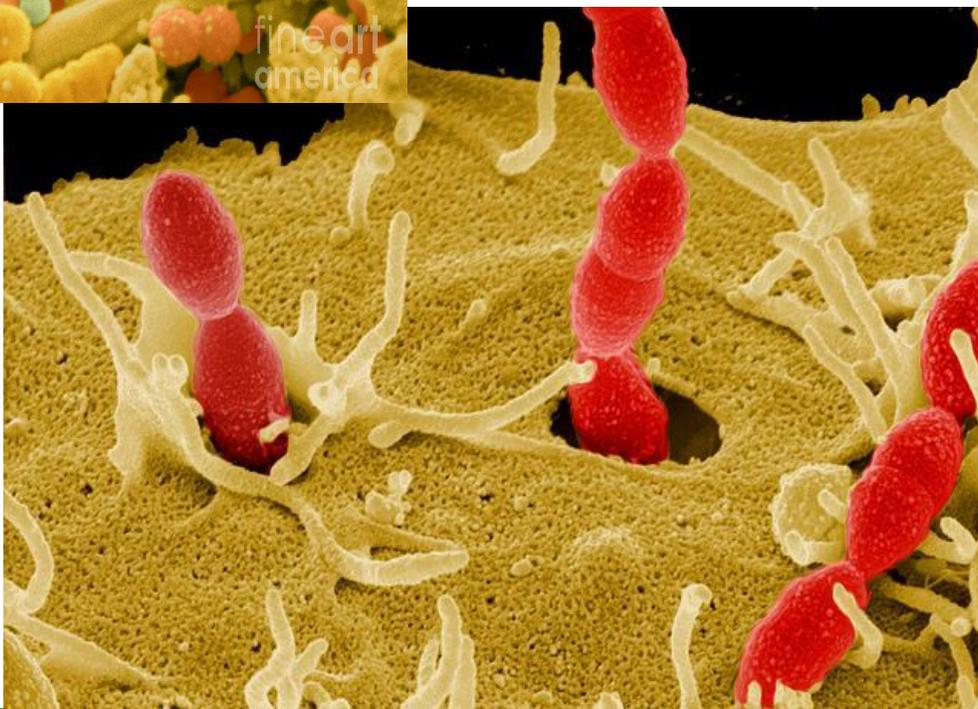
S.pneumoniae – самый частый возбудитель, на его долю приходится до 30-50% случаев ВП установленной этиологии.

При нетяжелом течении ВП актуальными являются M.pneumoniae и S.pneumoniae - их доля в этиологической структуре суммарно достигает 20-30%.

H.influenzae чаще вызывает ВП у пациентов с сопутствующей хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ);



K.pneumoniae и E.coli (реже других представителей семейства Enterobacterales) выявляют преимущественно у лиц с хроническими сопутствующими заболеваниями, такими как сахарный диабет (СД), хроническая сердечная недостаточность (ХСН), алкоголизм, цирроз печени и тяжелой ВП



S. aureus чаще ассоциируется с развитием ВП у лиц пожилого возраста, в/в наркоманов, на фоне или после перенесенного гриппа;

P.aeruginosa – с муковисцидозом, бронхоэктазами, применением системных глюкокортикостероидов (ГКС) в фармакодинамических дозах, предшествующей длительной АБТ

У 10-30% пациентов с ВП выявляется смешанная или ко-инфекция, которая может быть вызвана ассоциацией различных бактериальных возбудителей (например, *S.pneumoniae* с *H.influenzae* или *M.pneumoniae*), либо их сочетанием с респираторными вирусами. ВП, вызванная ассоциацией возбудителей, имеет тенденцию к более тяжелому течению и худшему прогнозу;

Для некоторых микроорганизмов (*S.viridans*, *S.epidermidis* и другие коагулазанегативные стафилококки, *Enterococcus spp.*, *Neisseria spp.*, *Candida spp.*) нехарактерно развитие бронхолегочного воспаления. Их выделение из мокроты с высокой степенью вероятности свидетельствует о контаминации материала микрофлорой верхних отделов дыхательных путей

Патогенез

Известно четыре патогенетических механизма, которые могут обуславливать развитие ВП:

аспирация секрета ротоглотки;

вдыхание аэрозоля, содержащего микроорганизмы;

гематогенное распространение микроорганизмов из внелегочного очага инфекции;

непосредственное распространение инфекции из соседних пораженных органов или в результате инфицирования при проникающих ранениях грудной клетки

Рубрика Нозологическая форма

J13 Пневмония, вызванная *Streptococcus pneumoniae*

J14 Пневмония, вызванная *Haemophilus influenzae*

J15 Бактериальная пневмония, не классифицированная в других рубриках (исключены: _____ пневмония, вызванная *Chlamydia* spp. – J16.0 и «болезнь легионеров» - A48.1)

J15.0 Пневмония, вызванная *Klebsiella pneumoniae*

J15.1 Пневмония, вызванная *Pseudomonas* spp.

J15.2 Пневмония, вызванная *Staphylococcus* spp.

J15.3 Пневмония, вызванная стрептококками группы В

J15.4 Пневмония, вызванная другими стрептококками

J15.5 Пневмония, вызванная *Escherichia coli*

J15.6 Пневмония, вызванная другими аэробными грамотрицательными бактериями

J15.7 Пневмония, вызванная *Mycoplasma pneumoniae*

J15.8 Другие бактериальные пневмонии

J15.9 Бактериальная пневмония неуточненной этиологии

Jain S, Self WH, Wunderink RG, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *The New England journal of medicine*. 2015;373(5):415-427. doi:10.1056/NEJMoa1500245

Исследование по этиологии пневмонии, проводимое Центром по контролю и профилактике заболеваний

- Участвовали 2.488 пациентов, больных пневмонией
- Возбудитель выявлен у 38% пациентов
- Только у 14% пациентов подтверждена бактериальная этиология

Цитата от авторов: “Низкий уровень выявления патогенов среди взрослых, госпитализированных с подозрением на пневмонию, подчеркивает необходимость в более чувствительных методах диагностики и инновационных технологиях обнаружения патогенов..”

КР ВП 2018

Микробиологическая диагностика

Микробиологическая диагностика при ВП включает **культуральное исследование мокроты и других респираторных образцов**, венозной крови, экспресс-тесты по выявлению пневмококковой и легионеллезной антигенурии, ПЦР-диагностику для выявления некультивируемых/трудно культивируемых бактериальных возбудителей и респираторных вирусов, иммуносерологические исследования

Микробиологическая диагностика

Преаналитический этап

Сбор и транспортировку образцов (проб) биоматериала проводят согласно Методическим указаниям МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

Сбор образцов биоматериала:

- Свободно отделяемая мокрота является оптимальным биоматериалом для микробиологического исследования респираторных инфекций
- Если получение свободно отделяемой мокроты затруднено или пациент не может откашливать мокроту (дети до 7-10 лет), то рекомендуется исследовать мазок со слизистой глубоких отделов задней стенки глотки
- Трахеальный аспират
- Образцы, полученные при бронхоскопии - бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) считается «золотым» стандартом для исследования респираторных образцов



Микробиологическая диагностика

Транспортировка проб:

Полученные образцы из нижних дыхательных путей рекомендуется как можно раньше отправлять в микробиологическую лабораторию. Если посев биоматериала откладывается более чем на 2-3 часа, образцы следует хранить при температуре 4–8 °С (но не более 24 ч от момента взятия).



www.simas.ru

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИ ИНДП

Перед посевом

- Производится визуальная оценка качества доставленного материала.

Визуальная оценка качества мокроты - характер: слизистая, слизисто-гнойная, стекловидная, слюна, кровянисто-гнойная, слизисто-кровянистая.

- Приготовление нативного мазка, окрашенного по Граму

Микроскопическое исследование:

Существует недостаточно доказательств достоверности рутинного использования микроскопии мазков респираторных образцов, окрашенных по Граму, в качестве маркера качества мокроты и предполагаемого выделения тех или иных микроорганизмов.

Не рекомендуется отбраковывать образцы мокроты и мазки с задней стенки глотки, основываясь на оценке мазка, окрашенного по Граму, из-за их малой информативности

Микробиологическая диагностика

Гомогенизация

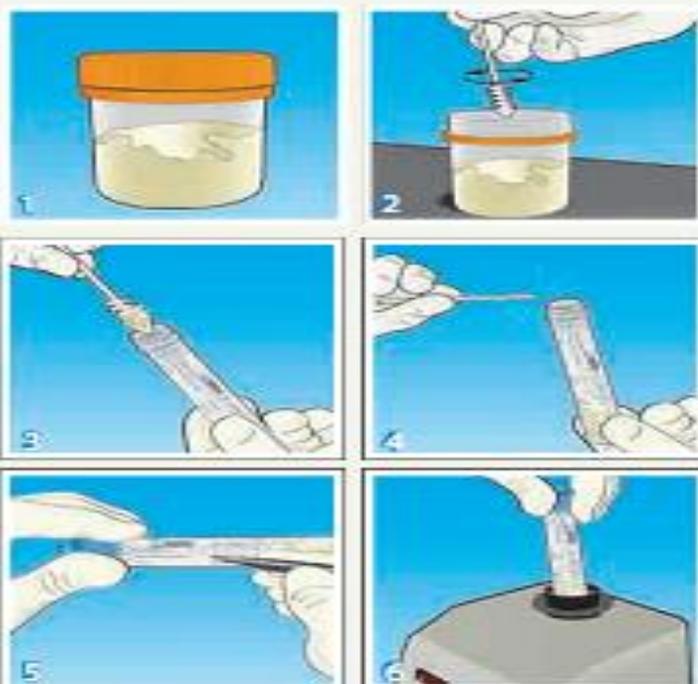
Использование муколитических препаратов позволяет сделать густую и вязкую мокроту более жидкой, что облегчает посев на питательные среды и улучшает поиск микроорганизмов, присутствующих в образце;

Нет достаточных доказательств того, что посев гомогенизированной мокроты имеет преимущества перед посевом необработанной мокроты





- **Готова к применению**
Стерильная пластиковая пробирка, содержащая муколитический агент Дитиотреитол (ДТТ). Предварительное увлажнение образца не требуется.
- **Чрезвычайно практична**
С помощью специального устройства (диппера) определенное количество образца мокроты переносится в пробирку с ДТТ и смешивается на вортексе: теперь образец мокроты разжижен и может быть засеян на чашки ручным или автоматизированным способом.
- **Дополнительные преимущества**
Система SLsolution стабильна при комнатной температуре и имеет длительный срок хранения благодаря уникальной упаковке.



SLsolution

Набор с устройством для переноса мокроты

1. Возьмите стерильный диппер (устройство для переноса мокроты)
2. Опустите диппер в контейнер с предварительно собранной мокротой. Объем собранной мокроты от 300 мкл до 1 мл не влияет на конечные результаты исследования
3. Возьмите индивидуальную упаковку, содержащую пробирку с SLsolution; откройте с пробирки крышку
4. С помощью диппера перенесите образец мокроты в пробирку, содержащую ДТТ, ручку диппера отломите в точке перелома
5. Закрутите пробирку
6. В течение 30 секунд смешивайте содержимое пробирки на вортексе при 2000/2500 об/мин, дополнив разжижения мокроты. Оставьте пробирку при комнатной температуре на 15 минут. Увеличение времени контакта образца с реактивом до 6 часов не оказывает влияния на выживаемость бактерий и грибов в исследуемом образце.
7. Соблюдая асептическую технику, осуществите посев и микроскопию образца.



Микробиологическая диагностика

Аналитический этап

Посев биоматериала:

Техника посева биологического материала на питательные среды предусматривает использование специальных ручных микробиологических приемов или посевных автоматизированных станций, разрешенных к использованию на территории РФ, позволяющих:

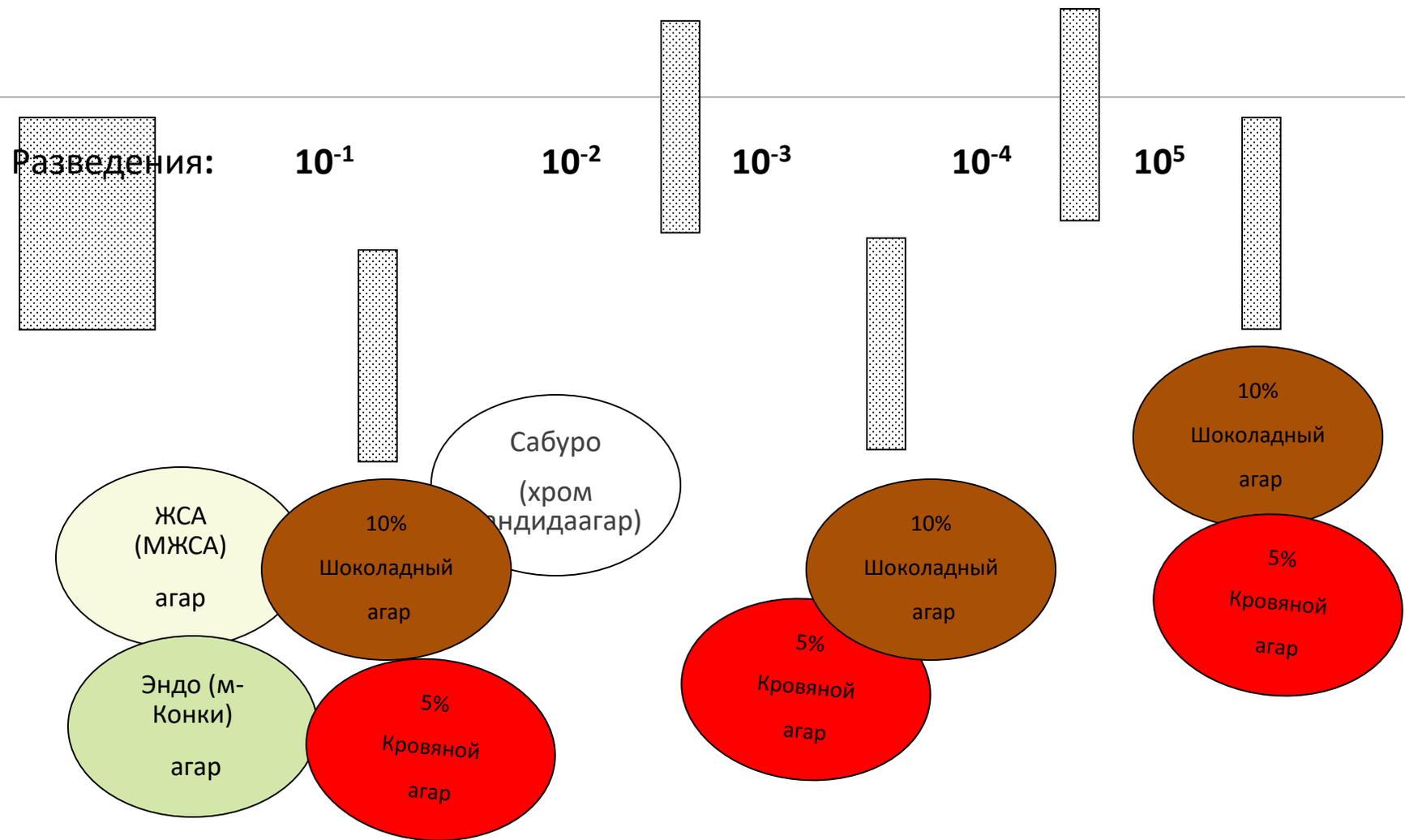
- получить рост присутствующей в образце микрофлоры для общей оценки бактериальной флоры;
- выявить ориентировочно количественный состав присутствующих в образце микроорганизмов.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИ ИНДП

Количественный посев мокроты

- Делают десятикратные разведения на 1-2% пептонной воде или питательном бульоне до 10^{-7}
- Из нечетных разведений делают посев по 0,1 мл на плотные питательные среды

Посев мокроты



Тампон с транспортной средой.

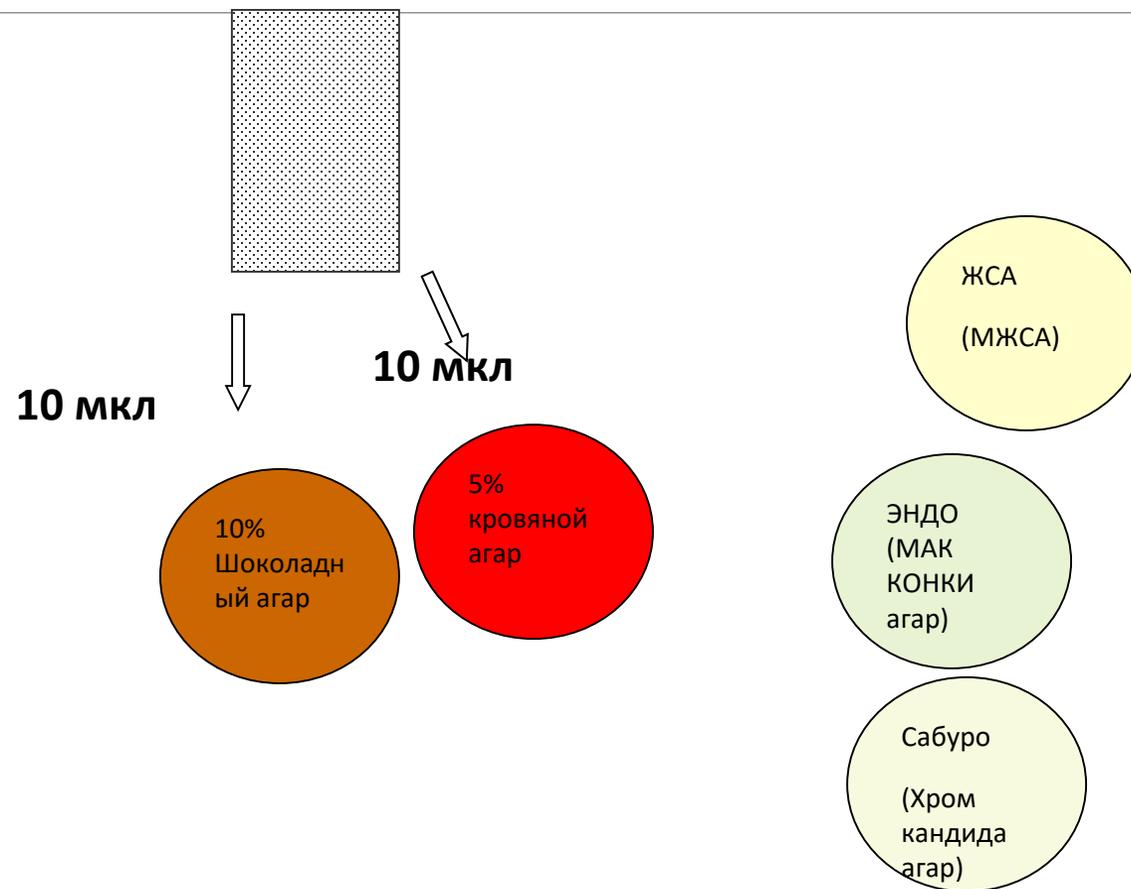
Мазки из глубоких отделов задней стенки глотки, взятые тампонами, тщательно суспензируют в 1 мл питательного бульона или в 0,9% физиологического раствора.

Данное разведение условно принимают за разведение 1:9.

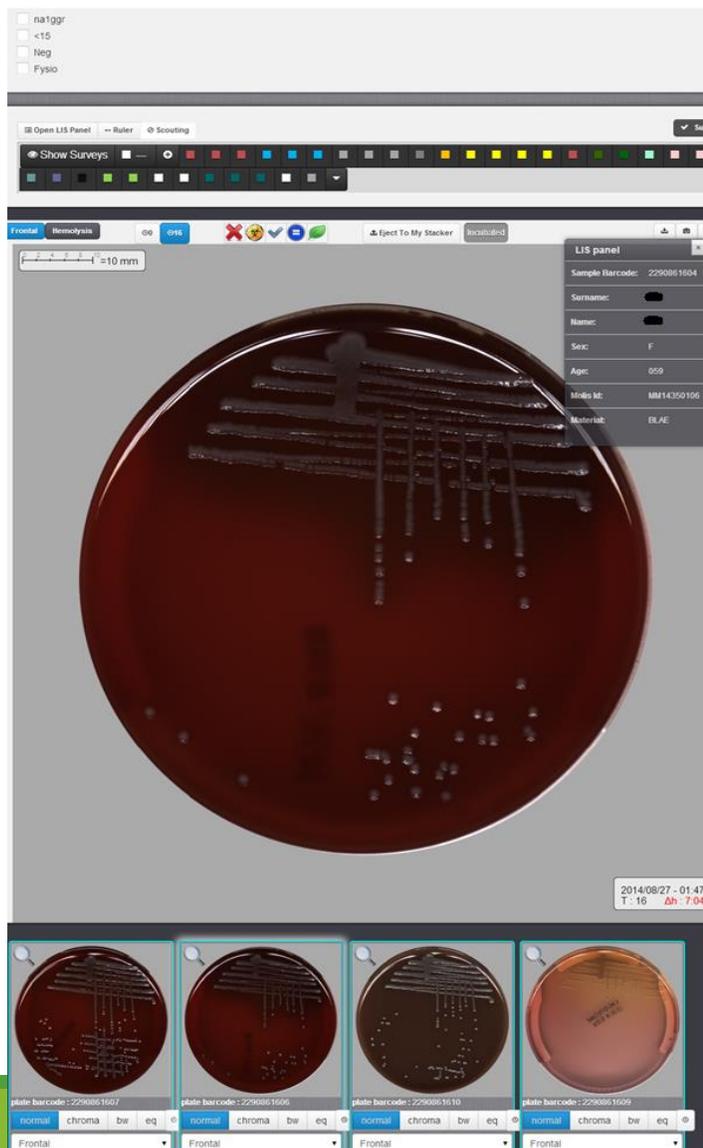
Затем аналогично готовят серийные разведения



Посев БАЛ



Стандартизация бактериологического посева



Подсчет и интерпретация результатов

Кол-во колоний в различных секторах				Кол-во бактерий в 1 мл мокроты
A	1	2	3	
5-10	-	-	-	10^3 КОЕ/мл
51-100	5-10	-	-	10^5 КОЕ/мл
Более 100	21-40	5-10	-	10^6 КОЕ/мл
	81-100	21-40	1-4	10^7 КОЕ/мл



ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОСЕВА

**КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫМ ПРИ
ПОСЕВЕ:**

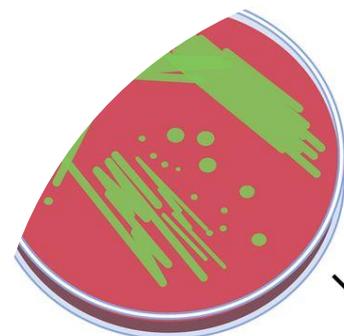
- МОКРОТЫ 10^5 ВЫШЕ

**- ТРАХЕАЛЬНОГО АСПИРАТА 10^4 И
ВЫШЕ**

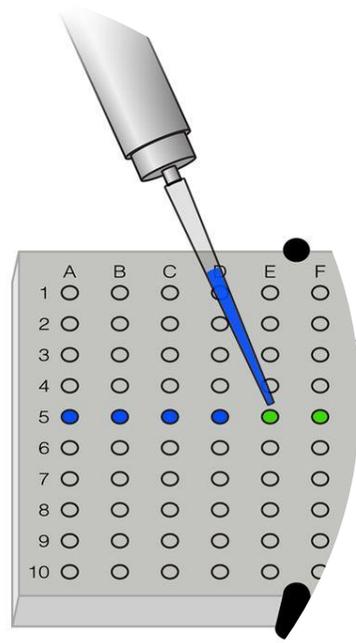
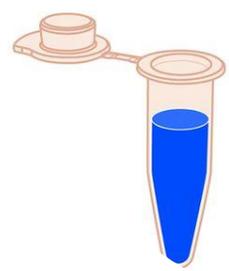
**- БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОГО
ЛАВАЖА 10^3**

После проведения микробиологического исследования с целью разделения этиологически значимых микроорганизмов от бактерий-контаминантов проводят количественный метод подсчета выделенных микроорганизмов. При этом учитывают, что возбудитель заболевания находится в исследуемом биологическом образце в существенно больших количествах по сравнению с бактериями-симбионтами.

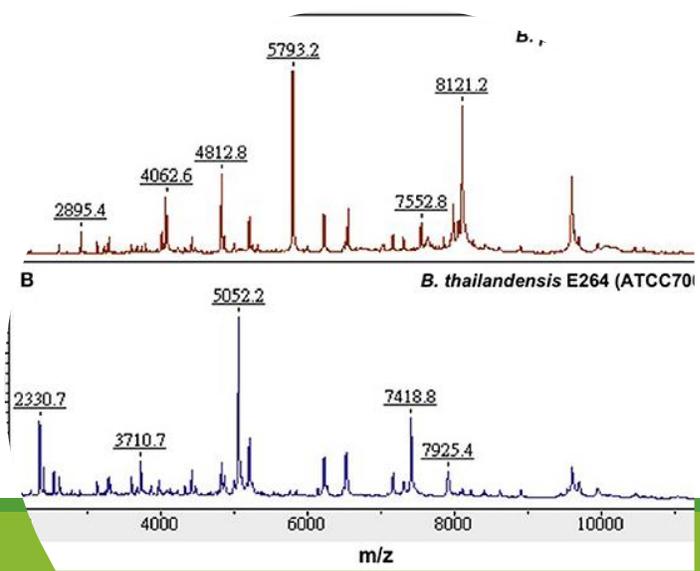
При интерпретации полученных данных следует учитывать, что у лиц со сниженным иммунитетом представители нормальной флоры в количественном отношении могут значительно превышать свои нормальные значения и в этом случае эту флору рассматривают как возбудителя инфекции.

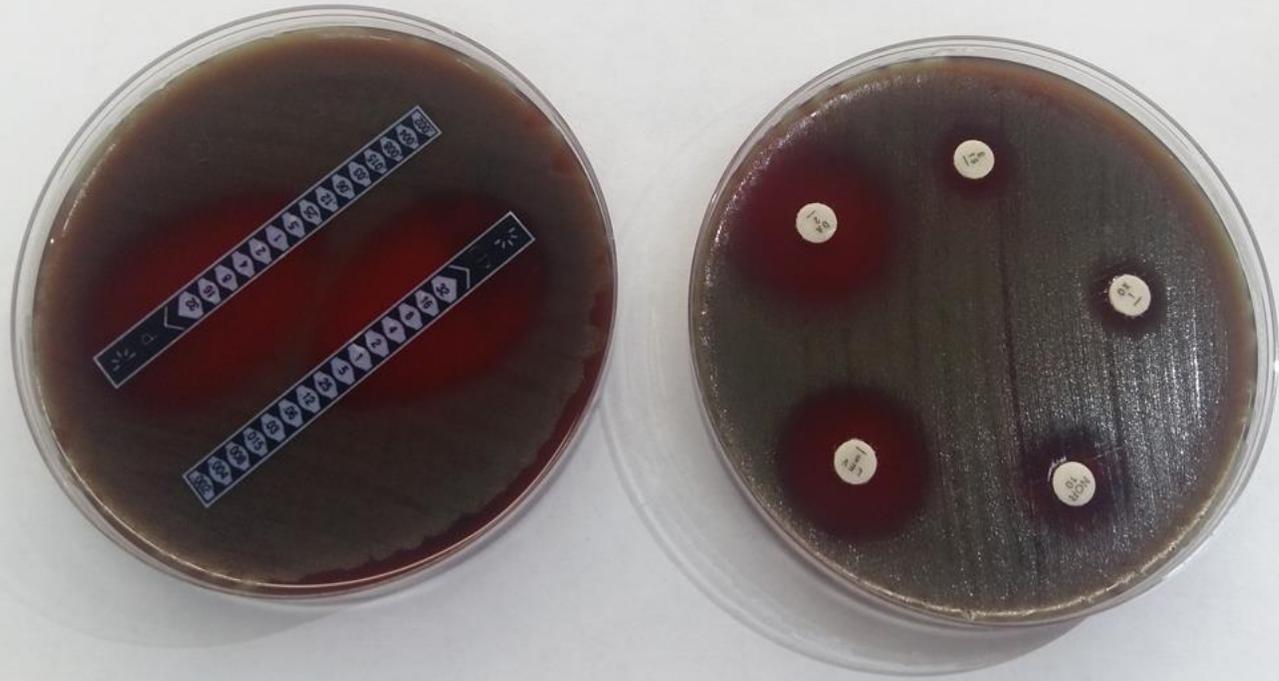


① Sample culture



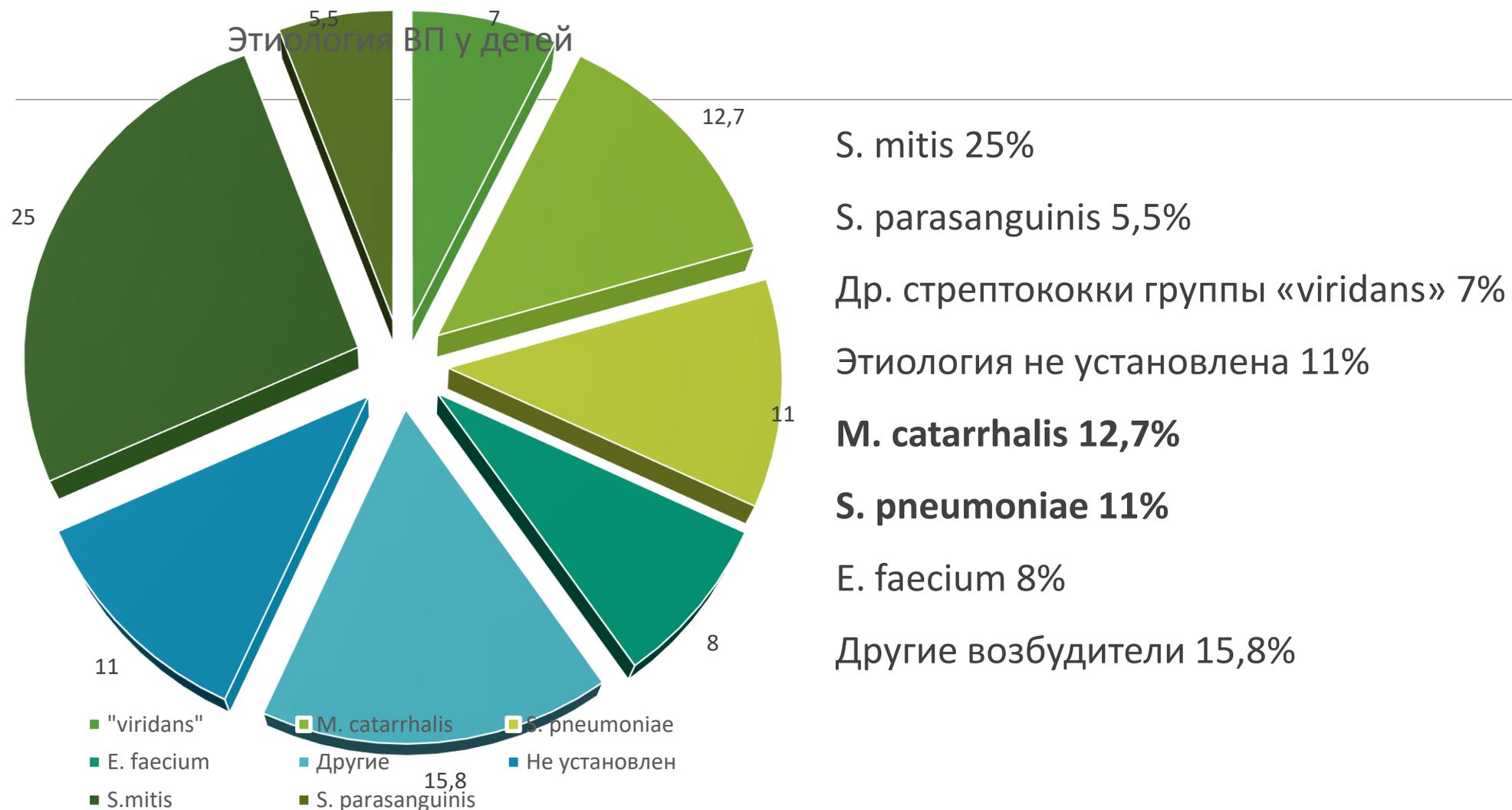
③





Группа		Типичные препараты	Ген - маркер резистентности	Бактерии - носители генов резистентности
β-лактамы антибиотики				
	пенициллины	ампициллин амоксициллин бензилпенициллин пиперациллин	TEM-1,2; SHV-1,11	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>(E.coli, Klebsiella spp., Proteus spp, Enterobacter spp., Serratia spp., Citrobacter spp., Shigella spp., Salmonella spp.),</i> <i>P. aeruginosa,</i> <i>Acinetobacter spp.</i>
	цефалоспорины	I поколение: цефазолин цефалотин цефалексин	CTX-M, SHV-5,12	
		II поколение: цефуроксим цефаклор		
		III поколение: цефотаксим цефтриаксон цефтазидим цефиксим		
		IV поколение: цефепим	AmpC	
карбапенемы	Меропенем Имипенем дорипенем	VIM, IMP, NDM, KPC, GES, OXA-20s, OXA-40s, OXA50s		
β-лактамы антибиотики		оксациллин	MecA	<i>S.aureus</i>
гликопептиды		ванкомицин	VanA, VanB	<i>E.faecalis, E.faecium</i>
		тейкопланин	VanA	
макролиды		эритромицин азитромицин klarитромицин	Mef, Erm	<i>Streptococcus spp.</i>
Фторхинолоны (II, III и IV поколение хинолонов)		II поколение: ципрофлоксацин офлоксацин III поколение: левофлоксацин IV поколение: Моксифлоксацин	GyrA, ParC, QnrA	<i>Streptococcus spp.</i> <i>P. aeruginosa,</i> <i>Enterobacteriaceae</i>

Этиология ВП у детей (по данным ДИКБ и УНМЛ)



Культуральное исследование двух образцов венозной крови

Бактериemia встречается при инфицировании разными возбудителями (энтеробактерии, *P. aeruginosa*, *S. aureus*), но наиболее характерна для ВП пневмококковой этиологии.

Культуральное исследование крови при высокой специфичности отличается низкой чувствительностью - частота положительных результатов гемокультуры варьирует от 5 до 30%.

Информативность исследования зависит от соблюдения правил получения, хранения и транспортировки клинических образцов. В частности, получение образцов крови на фоне АБТ как минимум в 2 раза снижает частоту положительной гемокультуры.

Синдромный подход к диагностике и решение вопроса о лечении пневмонии

КР ВП 2018

Микробиологическая диагностика

Микробиологическая диагностика при ВП включает культуральное исследование мокроты и других респираторных образцов, венозной крови, экспресс-тесты по выявлению пневмококковой и легионеллезной антигенурии, **ПЦР-диагностику для выявления некультивируемых/трудно культивируемых бактериальных возбудителей и респираторных вирусов**, иммуносерологические исследования

ПЦР

Полимеразная цепная реакция относится к молекулярно-генетическому методу микробиологического исследования, и уже широко применяется в комплексной диагностике инфекций

ПЦР дает возможность быстро и достоверно диагностировать коклюш и паракоклюш, проводить диагностику инфекций, вызванных такими вирусами, как респираторно-синцитиальный, метапневмовирус, вирусы парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов, коронавирус, риновирус, аденовирусы групп В, С и Е и бокавирус в клиническом материале.

По данным Главного внештатного специалиста МЗ РФ в ЦФО по клинической микробиологии и антимикробной резистентности И.С.Тартаковского респираторные микоплазмозы и хламидиозы составляют от 12 до 30%, но их невозможно выявить с помощью бактериологического исследования



Тест-системы ПЦР

ОРВИ-комплекс (ИнтерЛабСервис)

ОРЗ вирус –комплекс (ДНК-технология)

Пневмококк (ВекторБест)

Хламидии/микоплазмы пневмонии (ИнтерЛабСервис)

Пнемококк/гемофильная палочка/менингококк (ИнтерЛабСервис)

Определение биомаркеров

С-реактивный белок (СРБ)

Оптимальные диагностические значения 79-88 мг/л.
Однако интерпретация его содержания должна выполняться с большой осторожностью в связи с низкой специфичностью.

Пресепсин

- В связи с ограниченным объемом данных вводить его в качестве биомаркера преждевременно

Прокальцитонин (PCT)

В наибольшей степени отвечает свойствам биомаркера системной воспалительной реакции.
Позволяет дифференцировать инфекции бактериальной и небактериальной природы

Исследование уровня С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови

Уровень СРБ коррелирует с тяжестью течения, распространенностью воспалительной инфильтрации и прогнозом при ВП.

Отсутствие значимого снижения уровня СРБ на фоне АБТ у госпитализированных пациентов с ВП является предиктором более высокой летальности.

Наиболее ценным с практической точки зрения является исследование уровня СРБ у пациентов с неопределенным диагнозом ВП (отсутствие воспалительной инфильтрации у пациентов с характерным анамнезом, жалобами и локальными симптомами, свидетельствующими в пользу легочной консолидации); при концентрации >100 мг/л его специфичность в подтверждении диагноза превышает 90%.

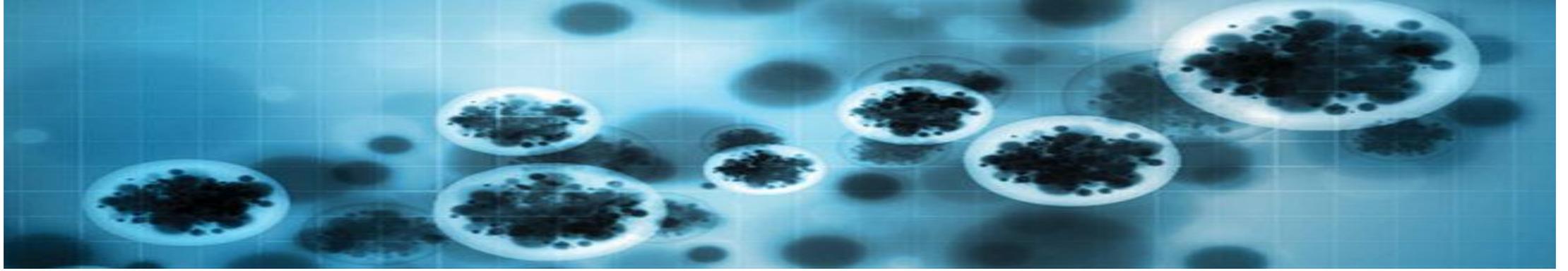
Напротив, при концентрации < 20 мг/л диагноз пневмонии является маловероятным.

Прокальцитонин – оптимальный маркер СВР

На сегодняшний день наиболее хорошо изученным и достаточно широко используемым в клинической практике является PCT.

У здоровых людей гормон кальцитонин (КТ) секретируется С-клетками щитовидной железы после внутриклеточного расщепления прогормона. Концентрация же самого PCT в плазме крови в норме ничтожна - (менее 0,1 нг\мл).

Однако, при СВР, индуцированной бактериями, наблюдается повышение его содержания в крови в диапазоне от 1нг\мл до 1000 нг\мл и выше без изменения концентрации КТ



Оказалось, что РСТ является приемлемым индикатором СВР бактериальной природы. При вирусных инфекциях, неопластических и аутоиммунных процессах синтез РСТ обычно не индуцируется.

Обобщая результаты 25 работ, включённых в недавний метаанализ, можно утверждать, что оптимальное диагностическое значение для пациентов с СВР лежит в диапазоне **1,0 – 1,2** нг\мл

РСТ можно использовать для оценки динамики СВР и контроля АБТ

РСТ включен во многие клинические рекомендации и СОПы

Алгоритм прекращения АБТ на основе ПКТ-теста может сократить затраты на одного пациента примерно на 3503 Евро

Экономия достигается сокращением срока госпитализации, сокращением числа гемокультур и числом дней АБТ

Дополнительные затраты на ПКТ-тест более, чем окупаются

Определение биомаркеров

С-реактивный белок (СРБ)

Оптимальные диагностические значения 79-88 мг/л.
Однако интерпретация его содержания должна выполняться с большой осторожностью в связи с низкой специфичностью.

Пресепсин

- В связи с ограниченным объемом данных вводить его в качестве биомаркера сепсиса преждевременно

Прокальцитонин (РСТ)

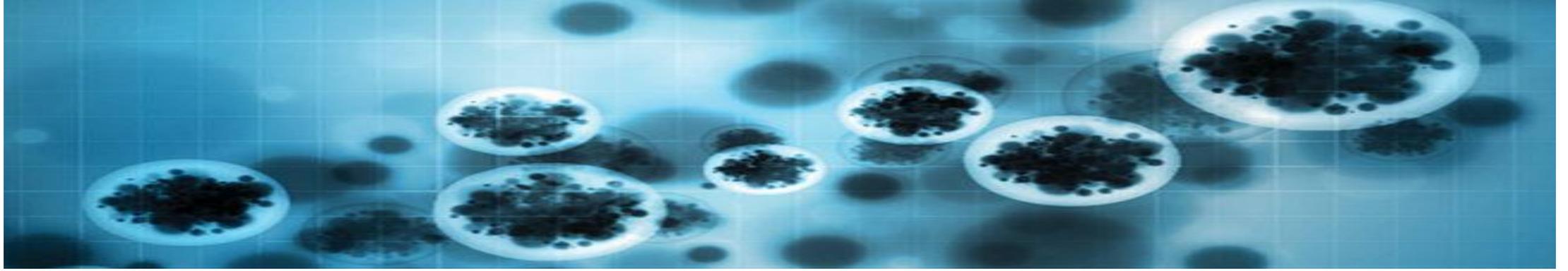
В наибольшей степени отвечает свойствам биомаркера сепсиса. Позволяет дифференцировать инфекции бактериальной и небактериальной природы

Прокальцитонин – оптимальный маркер СВР

На сегодняшний день наиболее хорошо изученным и достаточно широко используемым в клинической практике является PCT.

У здоровых людей гормон кальцитонин (КТ) секретируется С-клетками щитовидной железы после внутриклеточного расщепления прогормона. Концентрация же самого PCT в плазме крови в норме ничтожна - (менее 0,1 нг\мл).

Однако, при СВР, индуцированной бактериями, наблюдается повышение его содержания в крови в диапазоне от 1нг\мл до 1000 нг\мл и выше без изменения концентрации КТ



Оказалось, что PCT является приемлемым индикатором СВР бактериальной природы. При вирусных инфекциях, неопластических и аутоиммунных процессах синтез PCT обычно не индуцируется.

Обобщая результаты 25 работ, включённых в недавний метаанализ, можно утверждать, что оптимальное диагностическое значение для пациентов с сепсисом лежит в диапазоне **1,0 – 1,2** нг\мл

PCT можно использовать для оценки динамики сепсиса и контроля АБТ.

PCT включен во многие клинические рекомендации и СОПы

Алгоритм прекращения АБТ на основе ПКТ-теста может сократить затраты на одного пациента примерно на 3503 Евро

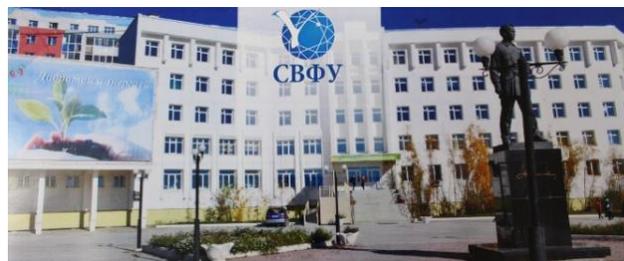
Экономия достигается сокращением срока госпитализации, сокращением числа гемокультур и числом дней АБТ

Дополнительные затраты на ПКТ-тест более, чем окупаются

Заключение

- На современном этапе имеется тенденция к уменьшению доли банальных бактериальных возбудителей в этиологии ИНДП, часто пневмонии развиваются на фоне ОРВИ, высока вероятность развития ИНДП, вызванных хламидиями и микоплазмами;
- Необходим синдромный подход к диагностике ИНДП, включающий бактериологическое исследование, ПЦР, определение биомаркеров системной воспалительной реакции;
- Синдромный подход позволяет определить тактику лечения (противовирусное, антибактериальное, отсроченное назначение АБТ, своевременное прекращение АБТ и т.д.)

ТОЧНОСТЬ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ



Благодарю за
внимание!

ВОПЛОЩЕНИЕ НАУЧНЫХ ИДЕЙ

