



Ключевые аспекты микробиологической диагностики у пациентов с муковисцидозом (МВ)

Поликарпова С.В.

ГКБ №15 им. О.М.Филатова

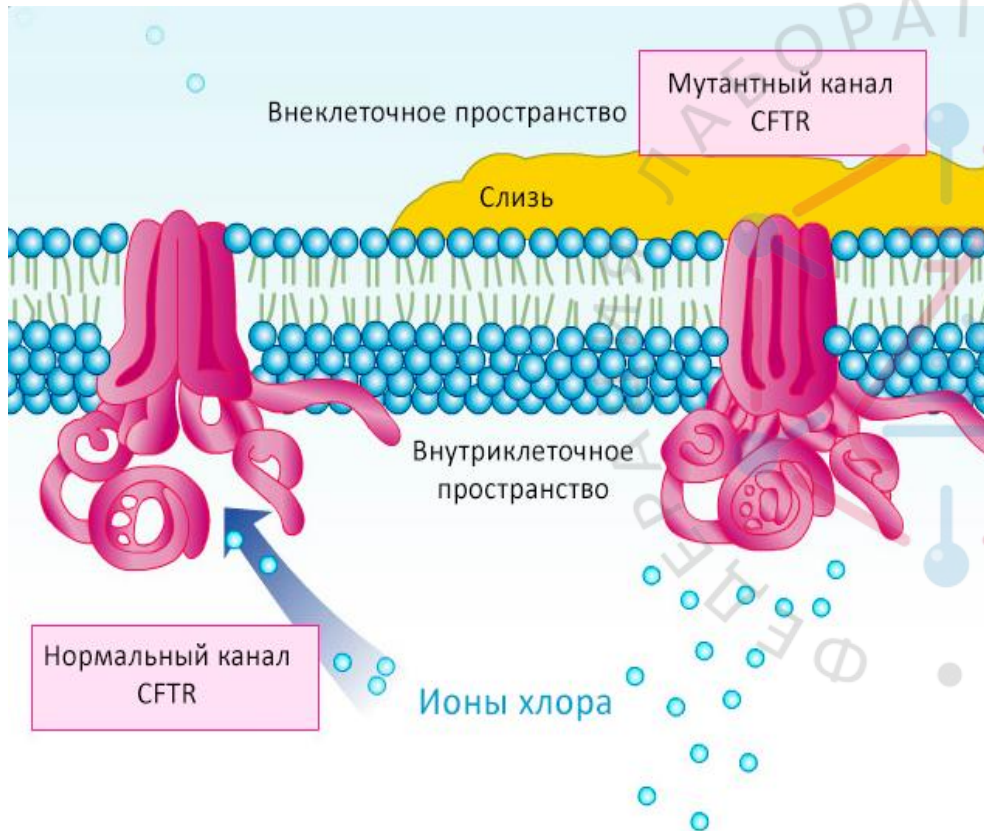
Жилина С.В.

Морозовская детская клиническая больница

III РОССИЙСКИЙ КОНГРЕСС ЛАБОРАТОРНОЙ
МЕДИЦИНЫ
МОСКВА

12 октября 2017г.

CFTR- трансмембранный регулятор муковисцидоза



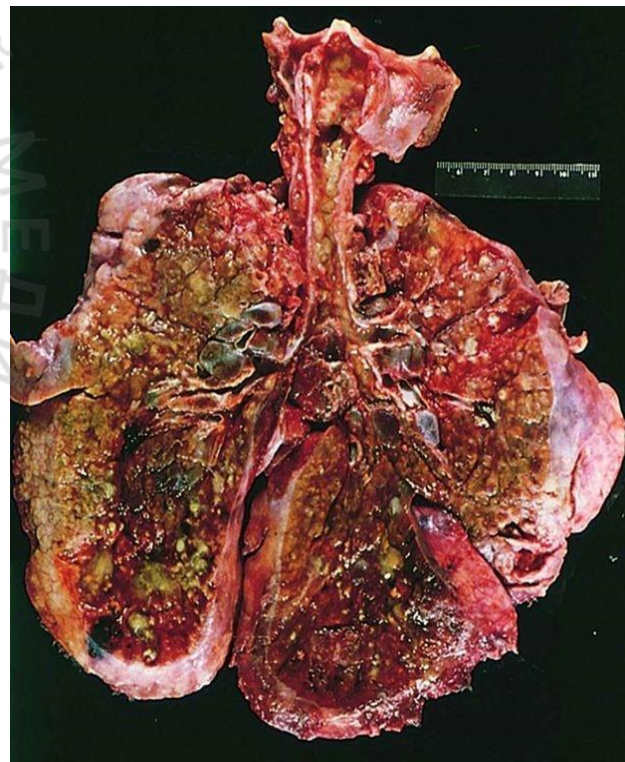
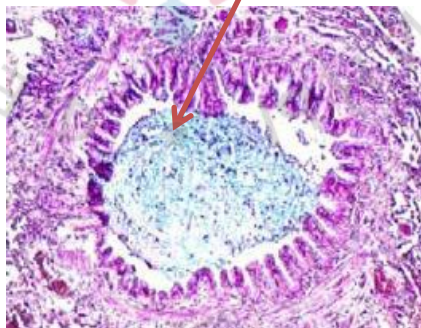
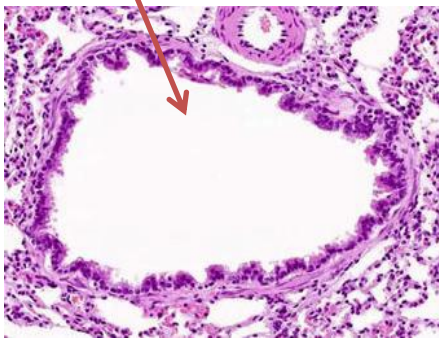
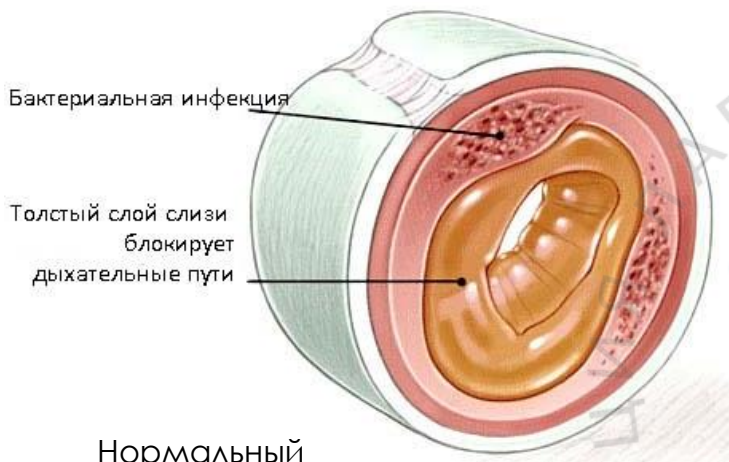
Снижение или отсутствие функции CFTR

Обезвоживание и нарушение мукоцилиарного клиренса на уровне ресничек, покрывающих поверхность дыхательных путей

Накопление слизи в дыхательных путях

Развитие инфекции

Дыхательные пути больного муковисцидозом



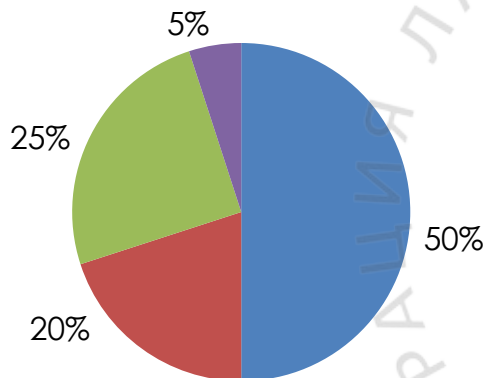
Особенности этиологии хронической респираторной инфекции при МВ

- Бактериальные инфекции легких при МВ – главный фактор, определяющий качество жизни и прогноз
 - Микрофлора при МВ качественно иная, чем при других инфекциях
 - Природная резистентность к антибиотикам у значительного числа патогенов – *B. cerasia complex*, *A. xylosoxidans*, *S. maltophilia* и ...
 - Приобретенная резистентность *P. aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *S. aureus*
-
- Стандарты терапии больных муковисцидозом: Европейский консенсус (2005г)
 - Национальный консенсус «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» (2016г)

Спектр микрофлоры нижних дыхательных путей

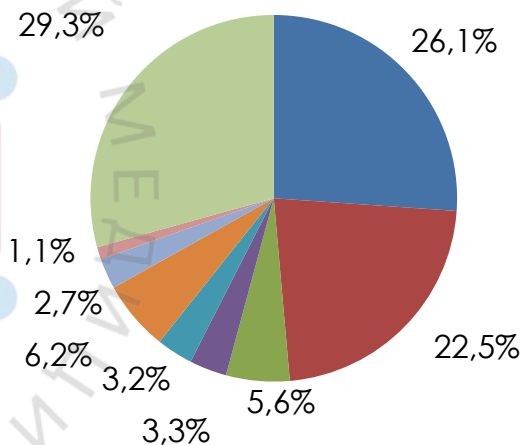
2007-2016гг. 7 095 респираторных образцов 12 639 штаммов микроорганизмов

Внебольничные пневмонии без МВ



- *S. pneumoniae*
- *H. influenzae*
- *C. pneumoniae, M. pneumoniae, L. pneumophila*
- *Enterobacteriaceae*

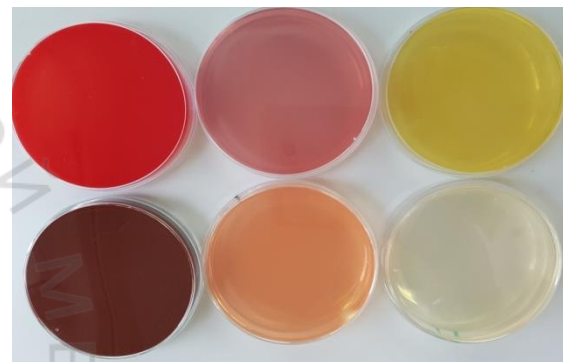
Хроническая респираторная инфекция при МВ



- *S. aureus*
- *B. cepacia complex*
- *A. xylosoxidans*
- *Aspergillus spp.*
- *P. aeruginosa*
- *S. maltophilia*
- *Enterobacteriaceae*
- *H. influenzae*

Рекомендуемые питательные среды для первичного посева

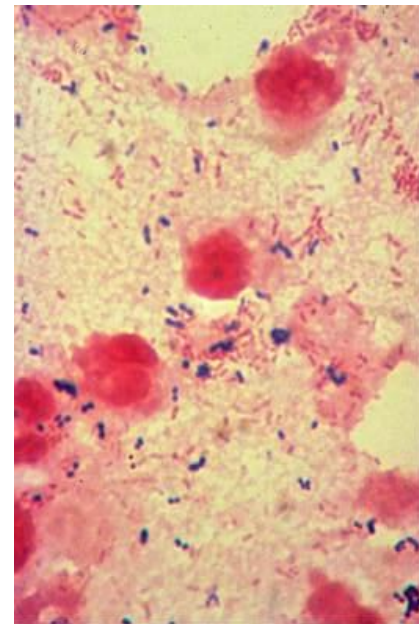
Питательная среда	Микроорганизм
Кровяной агар	Качественная оценка все выросшей микрофлоры
Шоколадный агар	<i>Haemophilus influenzae</i>
МакКонки (Эндо) агар	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Achromobacter</i> spp. НГОБ, <i>Enterobacteriaceae</i>
МСА (ЖСА, хромогенный) агар	<i>Staphylococcus aureus</i>
BCSA (селективный агар)	<i>Bulkholderia ceracia complex</i>
Сабуро агар	<i>Aspergillus</i> spp.
Кровяной агар с налидиксовой к-той	<i>Streptococcus pneumoniae</i>



Оценка качества респираторных образцов при МВ

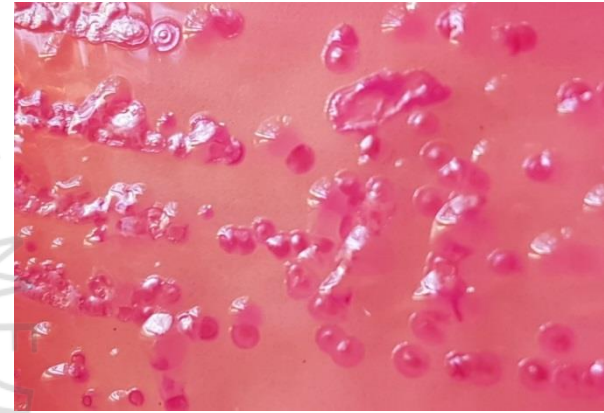
Окраска по Граму

- Учитывая наличие хронической бактериальной колонизации дыхательных путей больных МВ, микроскопическое исследование образцов мокроты проводить не рекомендуется
- Существует недостаточно доказательств достоверности рутинного использования микроскопии мазков респираторных образцов, окрашенных по Граму в качестве маркера качества мокроты и в качестве предполагаемого выделения тех или иных микроорганизмов.



Ключевые аспекты микробиологии муковисцидоза:

- Наличие многокомпонентных ассоциаций микроорганизмов
- Камуфлирование роста медленно растущих и более прихотливых микробов за счет быстрорастущих и нетребовательных к условиям роста микроорганизмов
- Наличие атипичных патогенов на плотных питательных средах:
 - мукоидные формы (*mucoid*)
 - фенотип мелких колоний (SCVs)
- Необходимость использования высокоселективных питательных сред



Фенотип малых колоний -SCVs (small colony variants)

- Рост микроорганизма в виде более мелких колоний при культивировании на плотных питательных средах
- Фенотип обнаружен у большого числа микроорганизмов:

S. aureus

P. aeruginosa

B. cepacia complex

S. maltophilia

Enterobacteriaceae



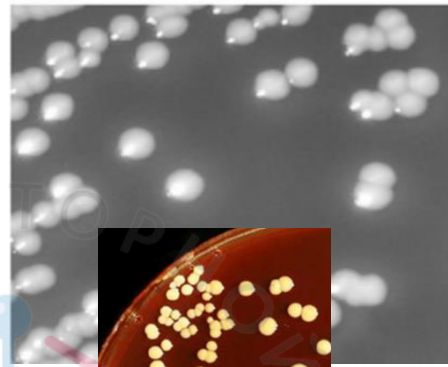
нормальный
фенотип

SCV
фенотип

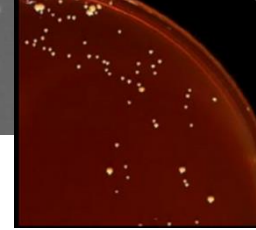
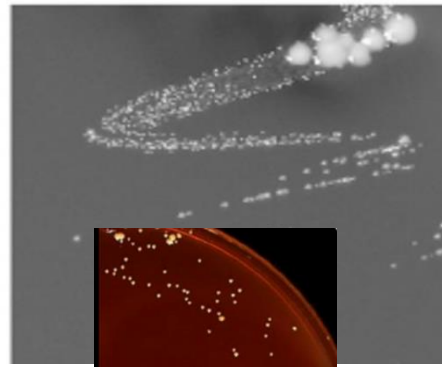
S. aureus

SCVs

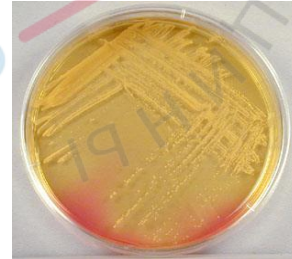
- Замедленный рост
- Отсутствие роста при пересевах
- Слабый пигмент
- Слабая коагулазная активность
- Могут вернуться к нормальным размерам
- Чаще выделяются у пациентов старшего возраста, длительно получающих антибактериальную терапию (бисептол) в ассоциации с *P. aeruginosa*



Нормальный
фенотип



SCV - фенотип



Нормальный
фенотип



Атипичный – маннитол -
отрицательный
фенотип

P. aeruginosa

Переход *P. aeruginosa* от
обычного фенотипа к
мукоидному-

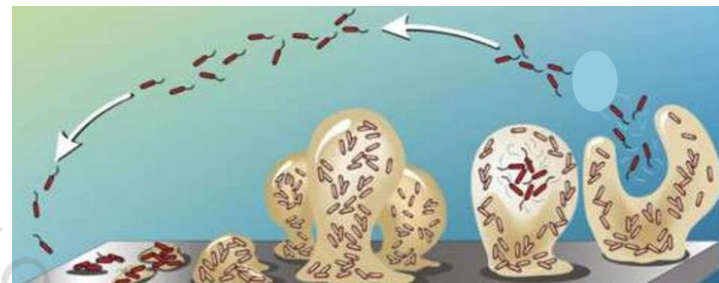
1. хронизация процесса
2. ускорение снижения легочной функции

Свойство слизистого экзополисахарида:

- нарушает нормальные фагоцитирующие функции
- содействует образованию биопленок

P. aeruginosa могут быть

- неподвижными,
- терять пигмент
- проявлять замедленную оксидазную реакцию



B. cerasia complex

Селективный агар для *B. cerasia complex*-
обязательное условие успешного выделения:

-полимиксин В/колистин

-тигециклин

- ванкомицин

-гентамицин

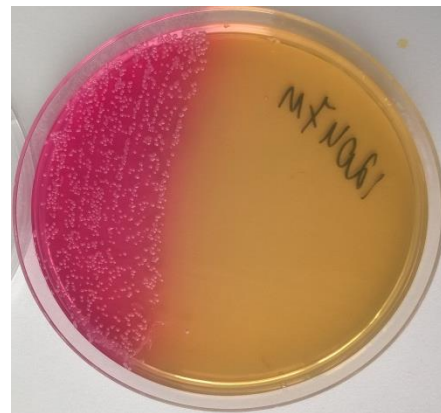
19 геномоваров

Этиологически наиболее значимые:

B. cenoceacia

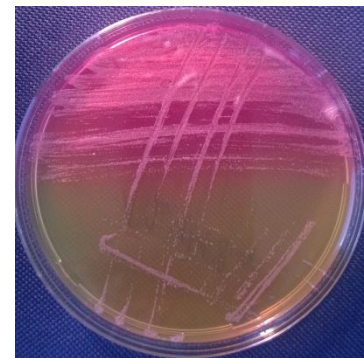
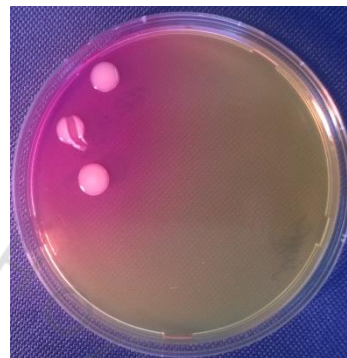
B. multivorans

B. dolosa



Murray S, Charbeneau J, Marshall BC, LiPuma JJ. 2008.
Impact of Burkholderia infection Am J Respir Crit Care Med 178:363–371.

B. cerasia complex



- Быстрое прогрессирование бронхолегочного процесса- «цепация-синдром» - некротизирующая пневмония с септициемией, нередко приводящую к летальному исходу.
- Продолжительность жизни пациентов с МВ с данной инфекцией снижается в среднем на 10 лет
- Больные, инфицированные *B. cerasias*, являются источником инфекции и представляют опасность для других пациентов
- Обладает природной устойчивостью ко многим антибиотикам

Achromobacter spp.



A. aegritas 6 ВИДОВ

A. dolens

A. anxifer

A. mucicolens

A. insuavis

A. sedimimum

A. pulmonies

A. animicus

A. spiritinus

A. insolitus

A. denitrificans

A. piechaudii

A. marplatensis

A. spanius

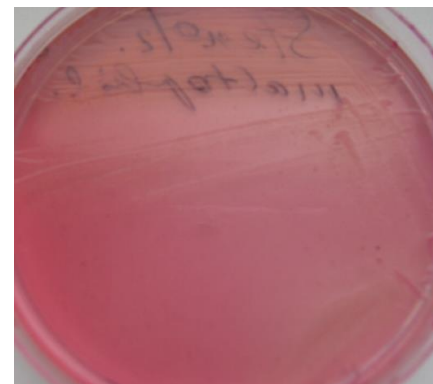
A. ruhlandii

A. xylosoxidans

- Все виды *Achromobacter* были выделены из клинического биоматериала или из окружающей среды стационаров
- *A. xylosoxidans* оппортунистический патоген человека. Выделение при МВ часто связано с инфекциями с клиническими проявлениями
- Широкий диапазон инфекций: бактериемия, менингит, пневмония и перитонит
- Внутрибольничные инфекции: контаминированные дез.средства, диализные жидкости
- Нет подробных доказательств его клинической значимости
- Обладает природной устойчивостью ко многим

S. maltophilia

- Не опасна для здоровых
- Значимый патоген для пациентов с МВ
- Внутрибольничные инфекции :
 - Лекарственные препараты, небулайзеры,
 - диализная жидкость
- Причина различных заболеваний
 - бактериемия, пневмония, менингит, инфекции мочевыводящей системы
- Способна к образованию биопленок и выживанию внутри них
- Обладает природной устойчивостью ко многим антибиотикам



Ключевой аспект микробиологической диагностики муковисцидоза:

время инкубации

Выделение некоторых патогенов может потребовать дополнительной инкубации, чтобы позволить медленно растущим колониям стать видимыми!

- *B. ceratia complex* - в течение 5 дней. Чашки с селективной средой должны просматриваться ежедневно.
- *P. aeruginosa*, *Achromobacter spp* - в течение 48 часов. При отсутствии роста инкубацию продлевают до 3-5 суток при ежедневном просмотре.
- Грибы- продление инкубации чашек с посевами до 7 суток при ежедневном просмотре позволяет увеличить вероятность обнаружения грибов



Ключевые аспекты микробиологии муковисцидоза: низкая достоверность идентификации на основании утилизации субстратов и типу дыхания

- Аэробные
- НГОБ
- Подвижные
- Каталаза +
- Оксидаза + (исключение *S. maltophilia* оксидаза + в 20%)
- Индол –
- Мочевина –
- H_2S –
- Потенциально могут быть все неверно идентифицированы
- Автоматическая идентификация на анализаторах:
 - слабое или неточное определение
- Ручные тест-системы с возможностью пролонгированной инкубации
- MALDI-TOF MS:
 - Опубликованные отчеты свидетельствуют о качественных результатах идентификации всех микроорганизмов, выделенных от пациентов с МВ

Ключевые аспекты микробиологии муковисцидоза

Идентификация, в особенности впервые, выполненная с использованием коммерческих биохимических тест-систем:

- *B. ceracia complex*
- *Achromobacter spp.*
- *Ralstonia spp*
- *Pandorea spp*
- *Cupriavidus spp.* и других колистин-устойчивых НГОВ

должна быть подтверждена молекулярными
методами

Ключевые аспекты микробиологии муковисцидоза

Идентификация, в особенности впервые, выполненная с использованием коммерческих биохимических тест-систем:

- 
- *B. ceracia complex*
 - *Achromobacter spp*
 - *Ralstonia spp*
 - *Pandorea spp*
 - *Cupriavidus spp.* и других колистин-устойчивых НГОБ

MALDI-TOF MS

должна быть подтверждена молекулярными
методами

- От качественных микробиологических исследований существенно зависит качество медицинской помощи, которую оказывают клиницисты больным муковисцидозом.
- От микроорганизмов, инфицирующих дыхательные пути, в значительной мере зависит лечение, качество жизни, перспективы трансплантации и продолжительность жизни



ПРОЕКТ

Клинические рекомендации

Кистозный фиброз (муковисцидоз): бактериологическая диагностика хронической респираторной инфекции и антибактериальная терапия

МКБ 10: E84

Возрастная категория: дети, взрослые

ИД:

Год утверждения: 2018 (пересмотр каждые 3 года)

Профессиональные организации:

- Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины» (Ассоциация «Ф.Л.М»);
- Межрегиональная ассоциация общественных объединений «Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии» (МАКМАХ).

ИНИЦИАТОР:

Совет по развитию и внедрению
инновационной и высокотехнологичной
микробиологической практики ФЛМ
(ИВМП)

Клинические рекомендации

«Кистозный фиброз
(муковисцидоз):

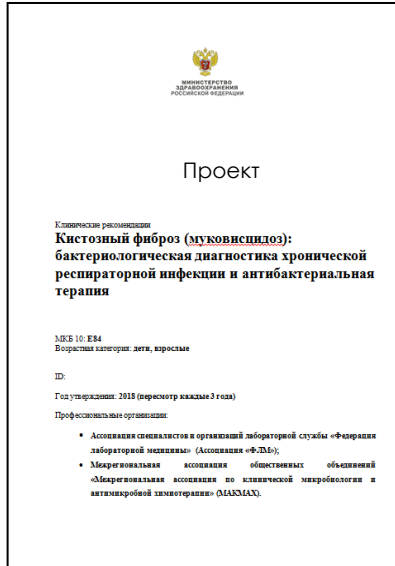
бактериологическая диагностика
хронической респираторной
инфекции и антибактериальная
терапия».

Основные разработчики-

- Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины» (Ассоциация «ФЛМ»)
- Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ)

Разработчики:

- Российское респираторное общество
- Всероссийская ассоциация для больных муковисцидозом
- Российское общество медицинских генетиков





МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Проект

Утвержденная рекомендация

**Кистозный фиброз (муковисцидоз):
бактериологическая диагностика хронической
респираторной инфекции и антибактериальная
терапия**

МДБ 10: КМ4

Возрастная категория: дети, взрослые

ID:

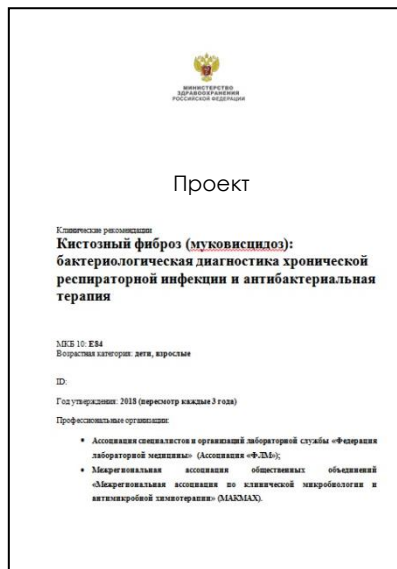
Год утверждения: 2018 (пересмотр каждые 3 года)

Профессиональные организации:

- Ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины» (Ассоциация «Ф.Л.М»);
- Межрегиональная ассоциация общественных объединений «Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии» (МАКМАХ).

■ Рекомендации предназначены для врачей-бактериологов, клинических фармакологов, пульмонологов, терапевтов, педиатров, реаниматологов.

■ Рекомендованы к использованию для специалистов медицинских организаций Российской Федерации любого уровня, имеющих лицензию на осуществление медицинской деятельности.



Клинические рекомендации устанавливают единые требования к бактериологическому исследованию материала из нижних дыхательных путей пациентов с муковисцидозом с целью:

1. Выделения и идентификации бактерий и грибов, которые колонизируя нижние дыхательные пути больных МВ, ведут к ухудшению дыхательной функции, могут быть источником инфицирования других пациентов с МВ и приводить к осложнениям после трансплантаций.
2. Обеспечения раннего выявления первичной колонизации *P.aeruginosa* и *B.cerascia complex*.
3. Предоставления всех необходимых рекомендаций для антибактериальной терапии



III РОССИЙСКИЙ КОНГРЕСС ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ

Благодарю за внимание

Ключевые аспекты микробиологической
диагностики у пациентов с муковисцидозом (МВ)

Поликарпова С.В.

E-mail: spolikarpova@mail.ru