

Научно-практическая конференция  
«Самарский форум лабораторной медицины: современные подходы к организации  
лабораторной службы, повышению качества и доступности клинических  
лабораторных исследований»

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ РАЗВИТИЯ  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Редкие и атипичные возбудители при  
заболеваниях органов дыхания: современные  
возможности лабораторной диагностики**

*Лямин Артем Викторович,  
к.м.н., доцент кафедры общей и клинической микробиологии,  
иммунологии и аллергологии СамГМУ,, врач-бактериолог  
микробиологического отдела КДЛ Клиники СамГМУ*

16.03.2018 г.  
г. Самара

## Приказ N 535 от 22 апреля 1985 г

«Этиологическая структура возбудителей инфекционных процессов в последнее десятилетие изменилась: значительно увеличился удельный вес заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами (около 200 видов условно-патогенных микроорганизмов). Возрастает роль неспорообразующих анаэробов и некоторых других видов микроорганизмов, роль которых в инфекционной патологии ранее была неизвестна»

Факультативные (условно патогенные)  
возбудители инфекционных заболеваний

200 (1985 г) -> 750 (2000 г)-> 4600 (2018 г)

видов микроорганизмов с потенциальным  
значением в патологии человека

# Состояние современной клинической микробиологии

## Внедрение современных методов идентификации:

- ▶ MALDI-ToF масс-спектрометрия (в Самарской области 5 приборов 2-х производителей)
- ▶ Внедрение современных методов микроскопии (РИФ, люминесцентные красители)
- ▶ Совершенствование биохимической идентификации и других способов видового определения микроорганизмов

Разработка и внедрение в практику Клинических рекомендаций по различным направлениям микробиологии (работа профессиональных сообществ)

# Респираторная микробиология

Быстроразвивающееся направление в клинической микробиологии

- ▶ ОРВИ и грипп
- ▶ Туберкулез
- ▶ Пневмонии
- ▶ Обострения ХОБЛ
- ▶ Обострения астмы
- ▶ Микозы легких
- ▶ Паразитарные заболевания

# «Редкие» и «атипичные» возбудители

- ▶ Нетуберкулезные микобактерии
- ▶ Нокардии
- ▶ Криптококки
- ▶ Пневмоцисты
  
- ▶ Возбудители «редких» микозов (родоторулы, экзофиалы, зигомицеты)
- ▶ «Атипичные» бактериальные возбудители (буркхольдерии, ациентобактерии, энтеробактерии)

# «Редкие» и «атипичные» возбудители - причины распространения

- ▶ Увеличение доли иммунокомпрометированных пациентов
- ▶ Вакцинопрофилактика, направленная против основных респираторных возбудителей
- ▶ Увеличение продолжительности жизни и повышение качества жизни пациентов с хроническими бронхолегочными заболеваниями
- ▶ Совершенствование методов диагностики

# Микроскопический метод исследования

- ▶ Цель - идентификация микроорганизмов до определенных таксономических единиц по морфологическим и тинкториальным свойствам
  
- ▶ Основные задачи:
  1. Определить морфологию микроорганизмов
  2. Определить цвет, в который окрашиваются определенные структуры клетки микроорганизмов
  3. Определить наличие или отсутствие микроорганизма в исследуемом материале



# Возможности микроскопии при выявлении «редких» микроорганизмов

- ▶ НТМБ
- ▶ Нокардии
- ▶ Грибы
- ▶ Пневмоцисты

# Таксономия НТМБ и нокардий

- ▶ Домен: Бактерии
- ▶ Тип: Актинобактерии
- ▶ Класс: Актинобактерии
- ▶ Порядок: Актиномицеты
- ▶ Семейства: *Mycobacteriaceae*
- ▶ *Nocardiaceae*

# Таксономическое положение нетуберкулезных микобактерий

По биохимическому составу и таксономическому положению наиболее близкими к микобактериям являются представители родов *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*.

# Нетуберкулезные микобактерии

- ▶ Возбудители микобактериозов человека и животных, многочисленная группа сапрофитов, обитающих в окружающей среде.
- ▶ Выделяют более 200 видов, из которых около 50 являются возможными этиологическими факторами заболеваний человека различной локализации

# Эпидемиология нокардиозов

- ▶ Нокардии широко распространены в природе, обычно выделяют из почвы и из разлагающихся органических субстратов.
- ▶ У человека могут выделяться в составе транзиторной нормофлоры (со слизистых оболочек верхних дыхательных путей, из желудочно-кишечного тракта, кожи).
- ▶ Вызывают оппортунистические инфекции - нокардиозы.

# Видовой состав (исторические аспекты)

- ▶ Поражения у человека вызывают чаще всего:
- ▶ *Nocardia asteroides* (80-90%)
- ▶ *Nocardia brasiliensis* (5-6%)
- ▶ *Nocardia caviae* (3%)
- ▶ Ежегодно в мире регистрируется 1500-2000 случаев нокардиозов

# Видовой состав (исторические аспекты)

- ▶ Поражения у человека вызывают чаще всего:
- ▶ *Nocardia asteroides* (80-90%)
- ▶ *Nocardia brasiliensis* (5-6%)
- ▶ *Nocardia caviae* (3%)
- ▶ Ежегодно в мире регистрируется 1500-2000 случаев нокардиозов
- ▶ Реальная картина ???????

# Нокардиозы и микобактериозы

Клиническая и рентгенологическая картина  
схожа с очаговыми формами туберкулеза

Возможно выделение микроорганизмов из  
крови!!!



## Особенности проведения микроскопии при выявлении представителей порядка *Actinomycetales*

- ▶ Не все НТМБ проявляют выраженную кислотоустойчивость
- ▶ Некоторые нокардии и другие представители порядка *Actinomycetales* могут проявлять выраженную кислотоустойчивость
- ▶ Метод окраски по Цилю-Нильсену имеет низкую диагностическую ценность

# «Новые» способы окрасок клинического материала для определения микрофлоры

- ▶ Использование люминесцентных красителей
  1. Аурамин ОО, Родамин С – микобактерии
  2. Калькофлюор белый - грибы

# Люминесцентные красители для выявления микобактерий

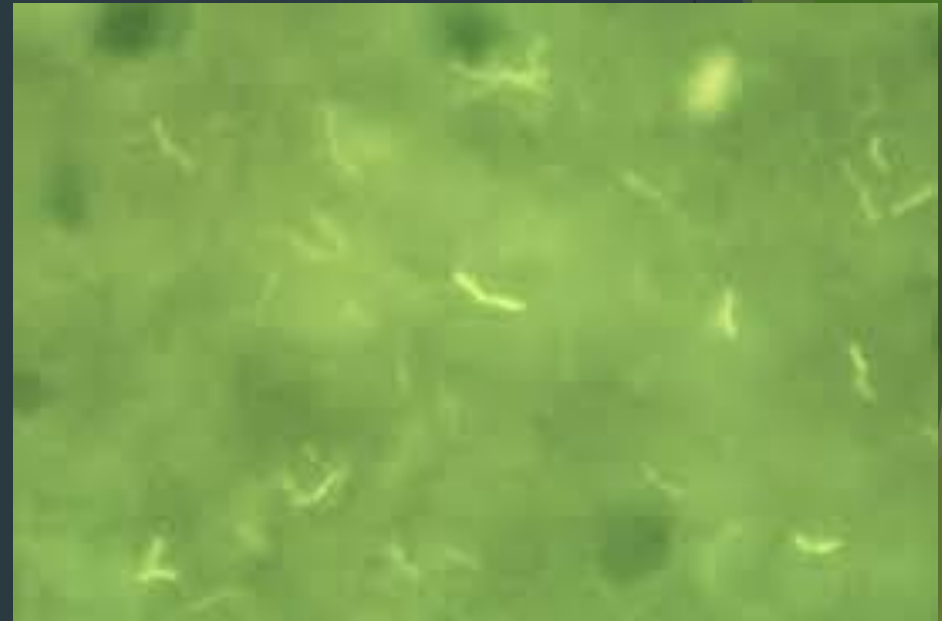
- ▶ Люминесцентные красители (аурамин ОО, родамин С и др.) связываются с воскоподобными структурами микробной клетки. При облучении окрашенных клеток возбуждающим светом они начинают светиться оранжевым или ярко-желтым светом на черном или темно-зеленом фоне.
- ▶ За счет свечения вокруг клетки образуется ореол, благодаря которому видимые размеры светящейся клетки превышают ее физические размеры.

# Люминесцентные красители для выявления микобактерий

- ▶ В связи с этим окрашенные флюорохромными красителями препараты обычно исследуются при увеличении 250х - 450х, тогда как окрашенные фуксином - при увеличении 800х - 1000х. Разница в увеличении позволяет микроскописту видеть одновременно в 4 - 10 раз большее поле зрения, что существенно сокращает время, необходимое для просмотра мазка. Подсчитано, что если микроскопическое исследование необходимой площади мазка при окраске по Ziehl-Neelsen продолжается приблизительно 10 минут, то для исследования той же площади мазка методом люминесцентной микроскопии потребуется только 2 - 3 минуты.

**ПРИКАЗ**  
**от 21 марта 2003 г. N 109**  
**О СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ**  
**ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ**  
**В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

# Микобактерии (окраска ауромин/родамин)



# Значение «редких» грибов при бронхолегочной патологии

- ▶ Криптококки

- ▶ Родоторулы

## Значение «редких» грибов при бронхолегочной патологии

- ▶ Криптококкоз у больных СПИДом развивается в 4-30% случаев
- ▶ Возможно развитие криптококкоза у иммунокомпетентных пациентов
- ▶ Чаще встречается у мужчин
- ▶ Заражение происходит ингаляционным путем



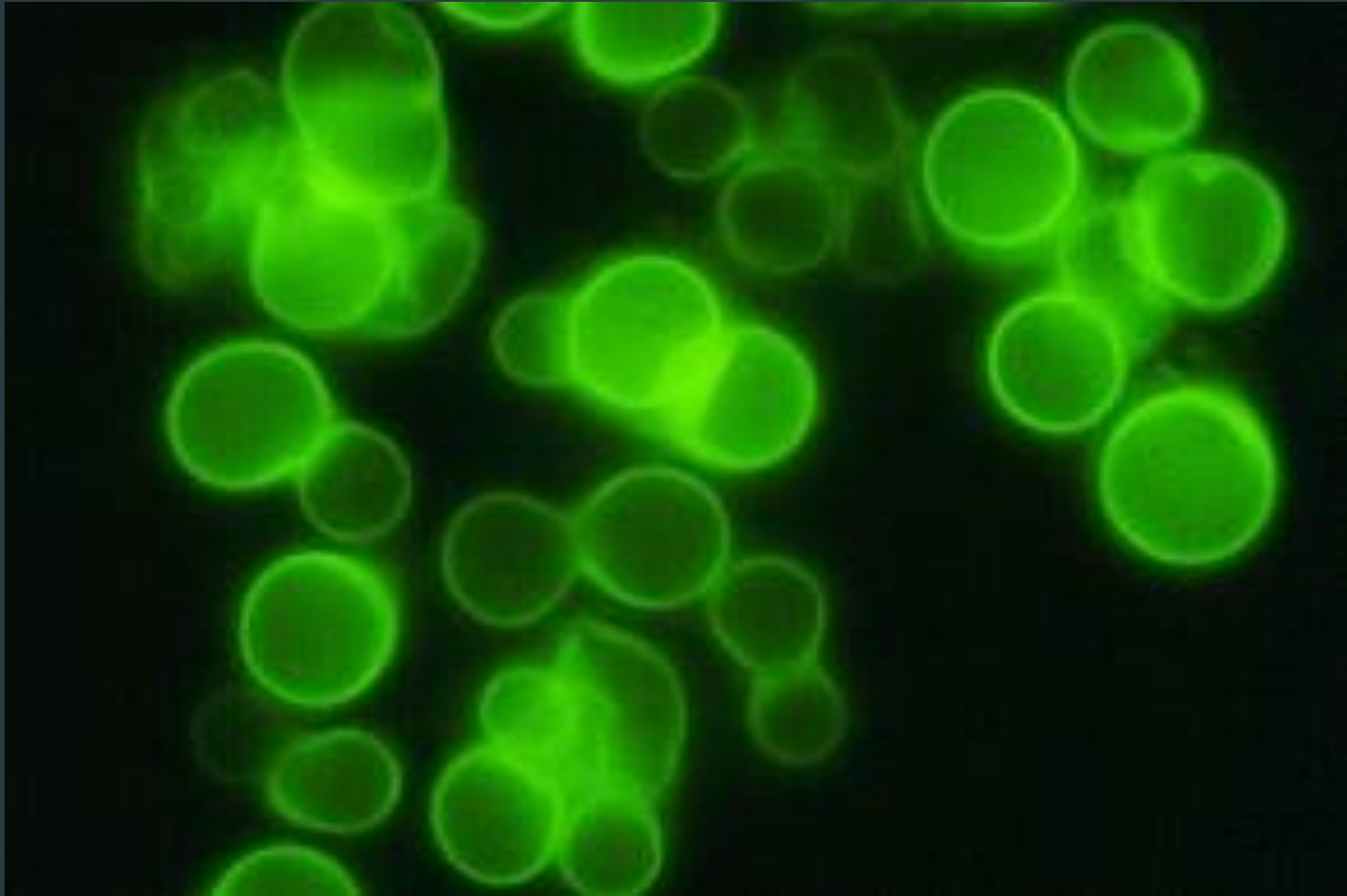
## Значение «редких» грибов при бронхолегочной патологии

- ▶ Родоторулы встречаются у иммунокомпрометированных пациентов
- ▶ Клиническая и рентгенологическая картина схожа с очаговыми формами туберкулеза

# Микроскопия грибов с использованием калькофлюора белого

При обследовании 25 пациентов с диагнозом «зооантропонозная трихофития» использовали 2 метода диагностики: с использованием 10%-ного раствора едкого калия (КОН) — 1-я группа и 10%-ного раствора КОН с добавлением калькофлюора белого — 2-я группа. Было установлено, что во 2-й группе положительный результат составил 88% случаев (22 больных), а в 1-й группе — 76% случаев (19 больных). Таким образом, использование калькофлюора белого на 11% повысило диагностические возможности микроскопии.

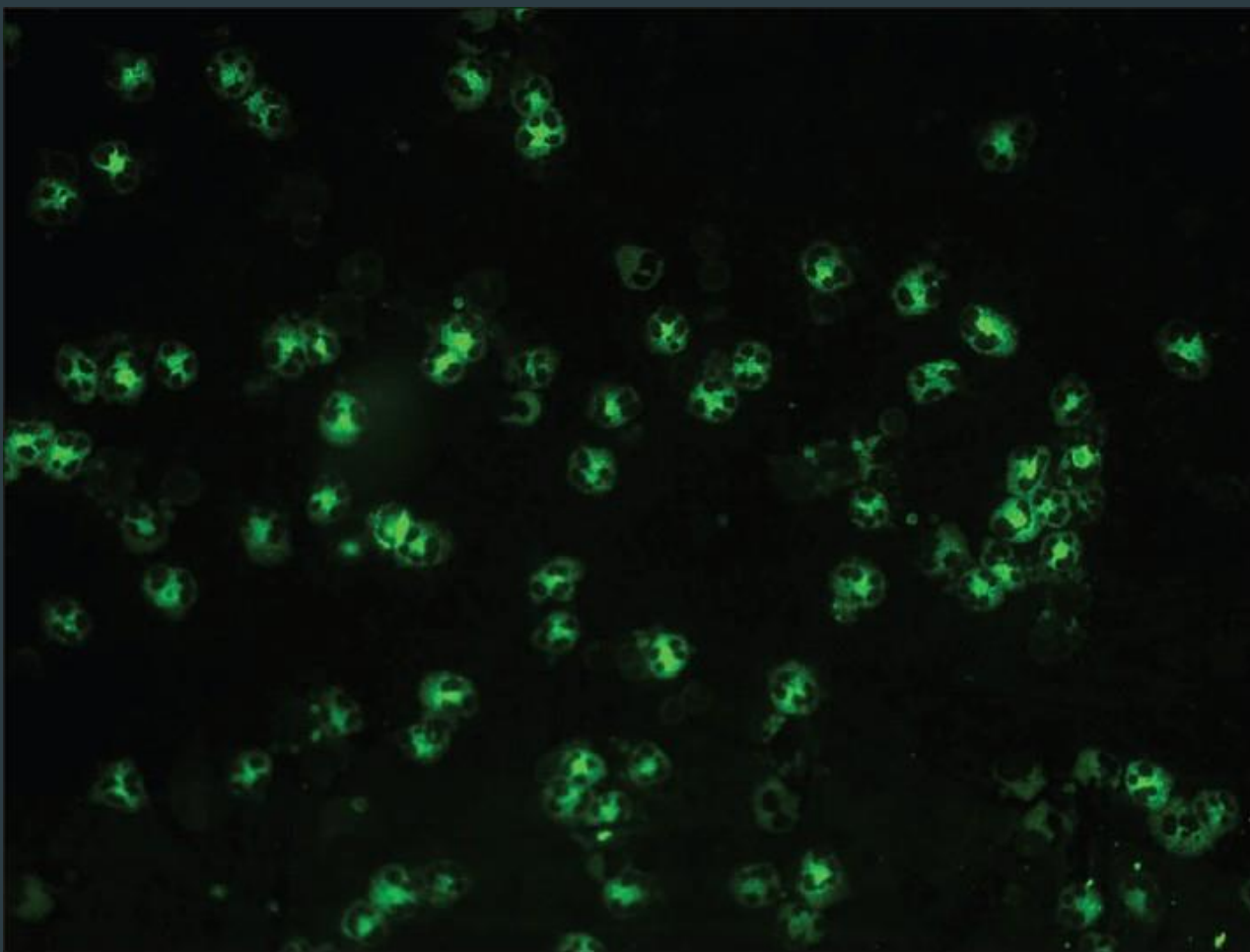
# Грибы (окраска калькофлюор белый)



## Диагностика пневмоцистозов

- ▶ По Гимзе (сложная верификация клеток)
- ▶ По Гомори-Грокотту (преимущественно цисты)
- ▶ Толуидиновым синим (преимущественно цисты)
- ▶ По Граму-Вейгерту (сложная верификация клеток)
- ▶ По Папаниколау (сложная верификация клеток)
- ▶ Калькофлюором белым (сложность дифференциации от других грибов)

## Иммунофлюоресценция (высокая чувствительность и специфичность)



# Особенности распространенности «классических» бактериальных возбудителей при внебольничной пневмонии

*Streptococcus pneumoniae*    **очень часто**

*Chlamydophila pneumoniae*

*Mycoplasma pneumoniae*

*Legionella pneumophila*

*Haemophilus influenzae*

*Staphylococcus aureus*

*Klebsiella pneumoniae*

Другие энтеробактерии

*Pseudomonas aeruginosa*

Другие НФГОБ

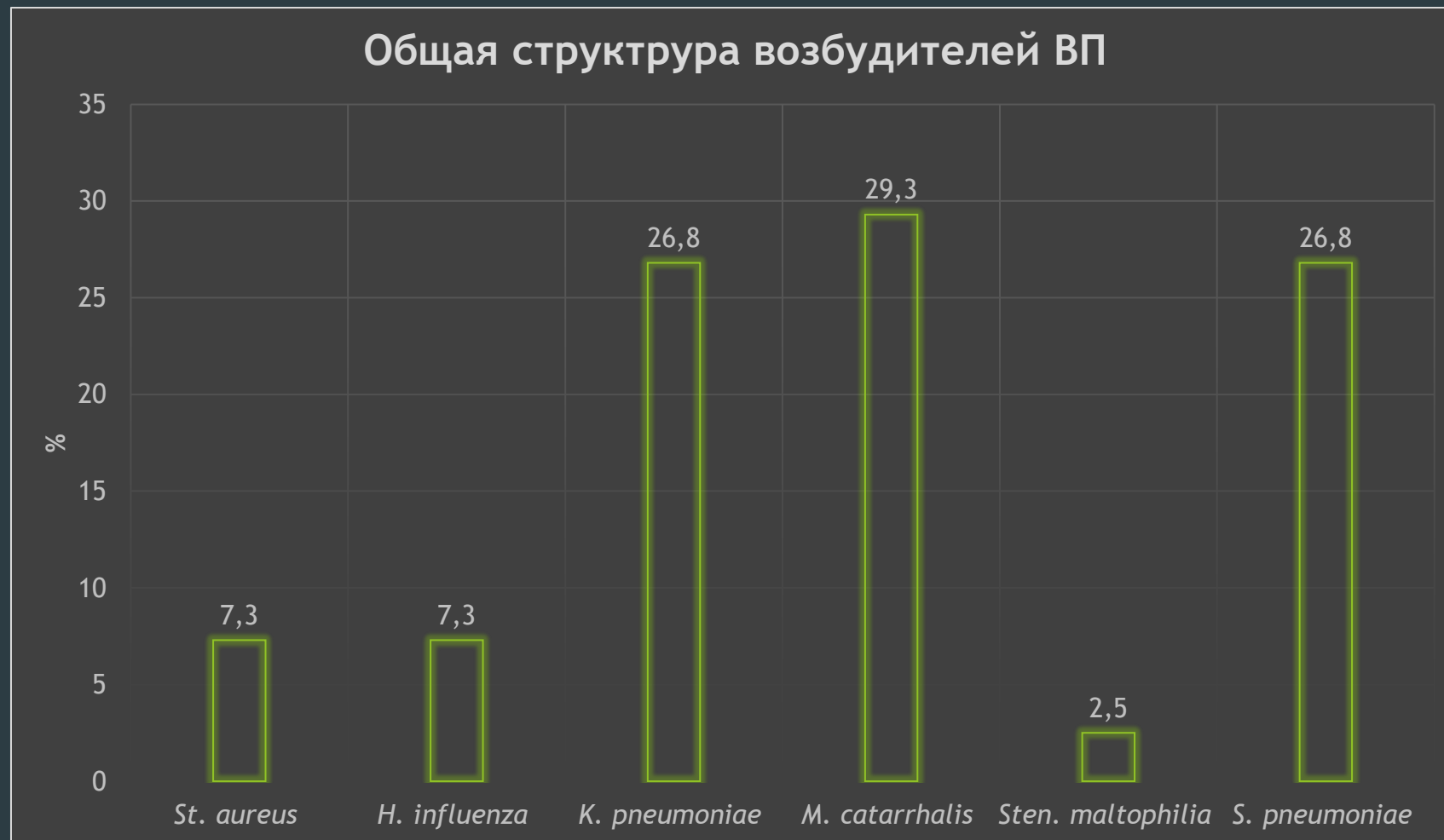
**часто**

**часто**

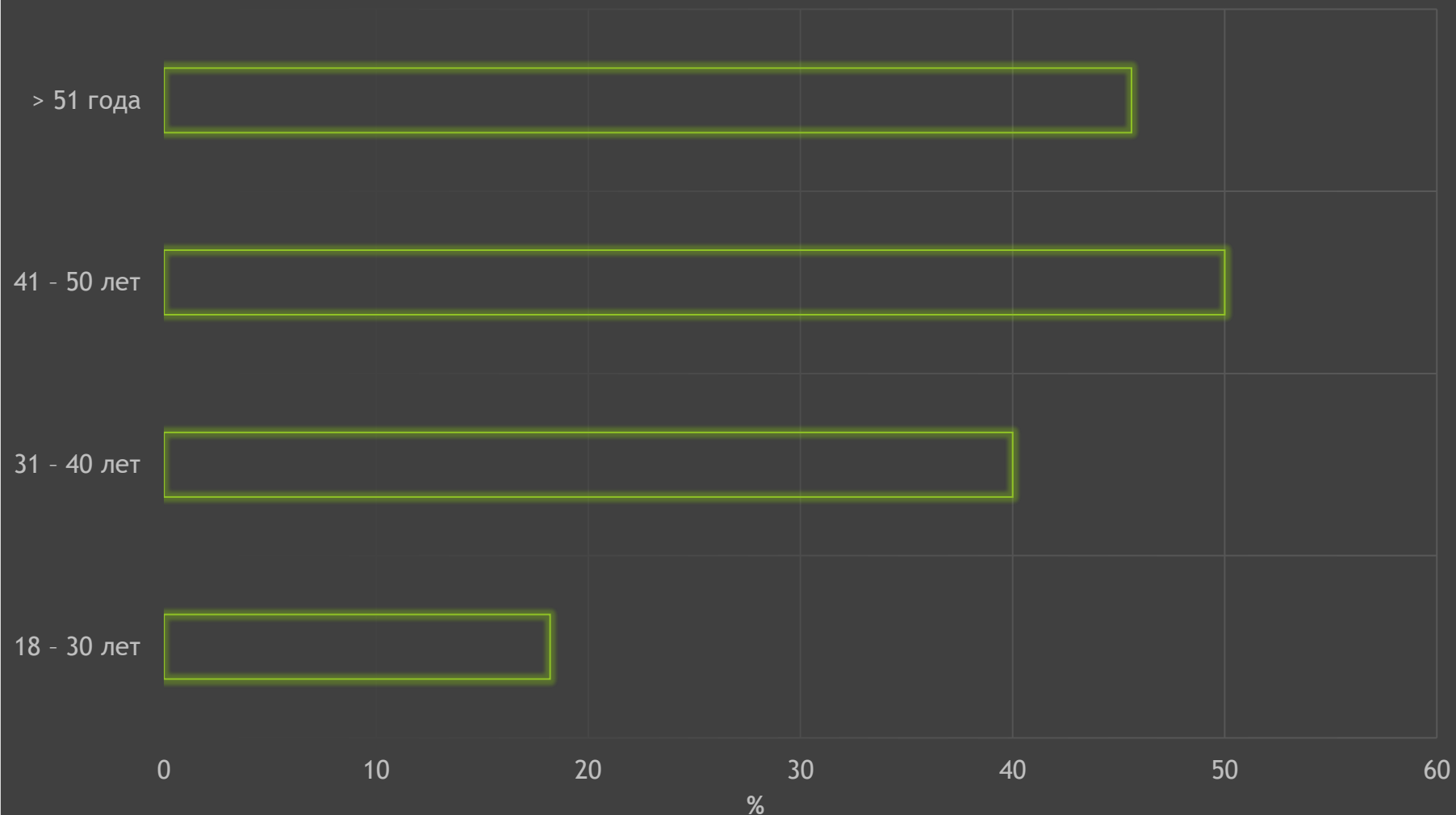
**редко**

**очень редко**

# Особенности распространенности «классических» бактериальных возбудителей при внебольничной пневмонии

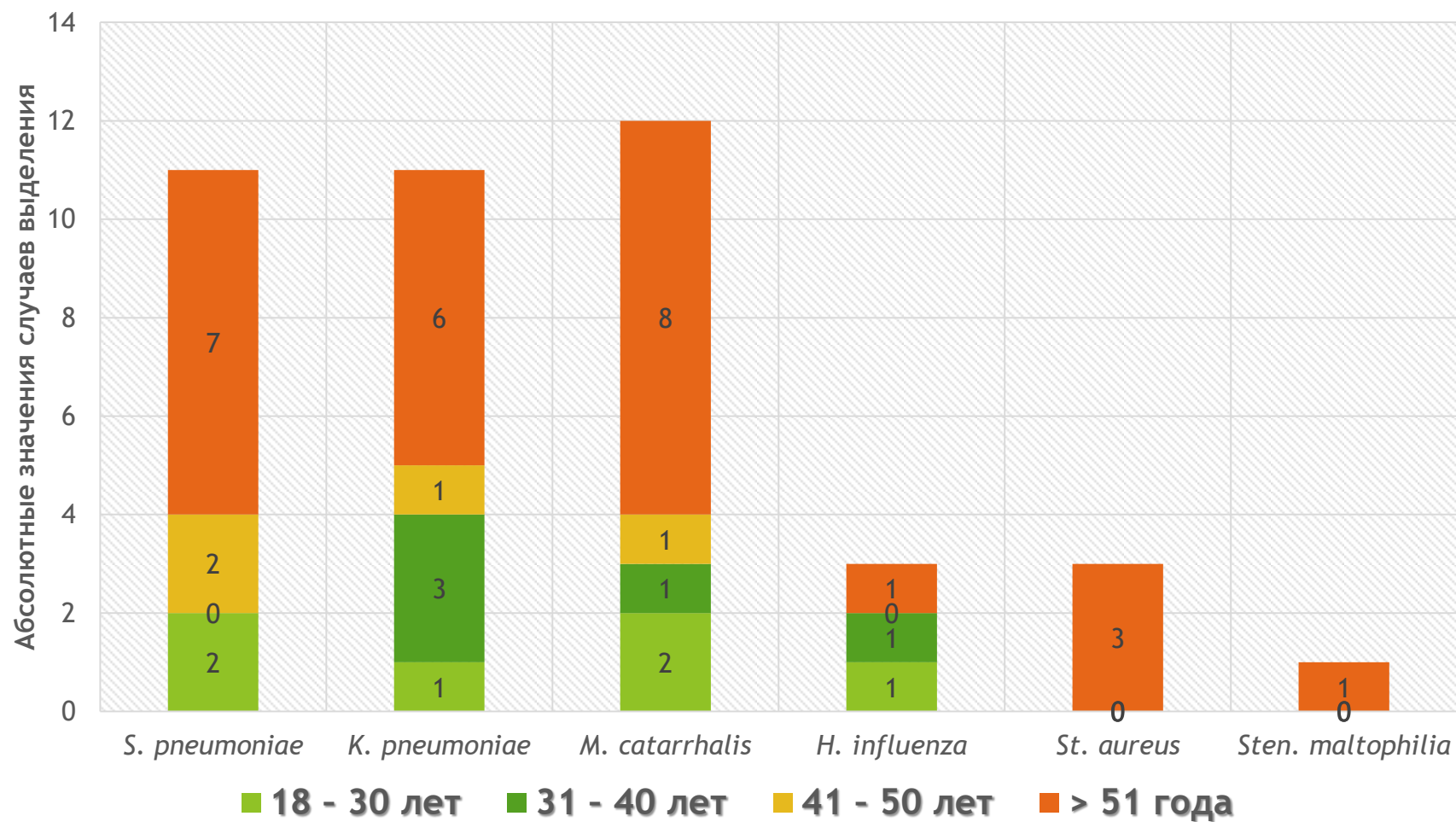


## Выделение клинически значимой бактериальной флоры в возрастных категориях





## Распределение возбудителей в возрастных группах



## Заключение

- ▶ Изменения в популяции пациентов неизбежно влекут за собой изменения в структуре возбудителей патологических процессов
- ▶ Совершенствование лабораторной диагностики ставит перед бактериологами задачи выделения и идентификации новых микроорганизмов, а перед клиницистами задачи выбора адекватных методов диагностики для верификации диагноза и подбора терапии

# Заключение

- ▶ Инфекции, вызванные «редкими» микроорганизмами - вершина айсберга, которую мы наблюдаем, время от времени, и к которому неизбежно движемся...
- ▶ Готовы ли мы к столкновению?

Благодарим за внимание!