



Диагностика бактериемий /фунгемий/

С. В. Поликарпова, к.м.н., заведующая бактериологической лабораторией
ГКБ № 15 им. О. М. Филатова ДЗ г. Москвы

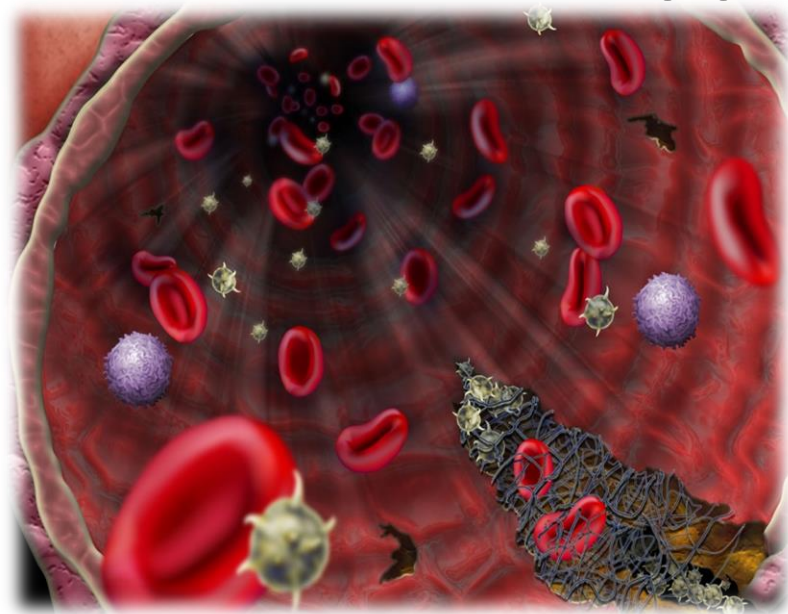
С.В. Жилина , к.м.н., Морозовская детская клиническая больница ДЗ г. Москвы

НИЖНИЙ НОВГОРОД
31 марта 2017г.

Лабораторная диагностика бактериемии и
фунгемии остается одной из наиболее важных
задач клинической микробиологической
лаборатории...



...несмотря на все недостатки,
гемокультивирование остается несовершенным
ЗОЛОТЫМ СТАНДАРТОМ лабораторной диагностики
бактериемии и фунгемии



Manual of clinical microbiology, 11th ed., 2015
Laboratory Detection of Bacteremia and Fungemia
MICHAEL L. WILSON, MELVIN P. WEINSTEIN, AND L. BARTH RELLER®



- **Инфекция кровотока** - положительный посев крови связан с клиническими признаками и симптомами инфекции.
- **Сепсис** - клиническое понятие. Синдром системной воспалительной реакции в ответ на инфекцию.
- **Бактериемия/фунгемия** - микробиологическое понятие, подтверждение присутствия микроорганизмов в исследуемом образце крови при его посеве
- **Гемокультура** – образец крови определенного объема, инокулированный в один или несколько флаконов с питательной средой в целях диагностики бактериемии
- **Положительная культура** – получен рост микроорганизмов во флаконе с питательной средой.
- **Отрицательная гемокультура**- отсутствие роста во флаконе с питательной средой в течение 5-7 дней инкубирования гемокультуры
- **Контаминация** – загрязнение образца крови при несоблюдении медицинским персоналом правил асептики и антисептики при заборе крови у больного, а также при работе с гемокультурами в лаборатории.

Клиническая значимость регистрации бактериемии/фунгемии



подтверждение диагноза и определение этиологии инфекционного процесса

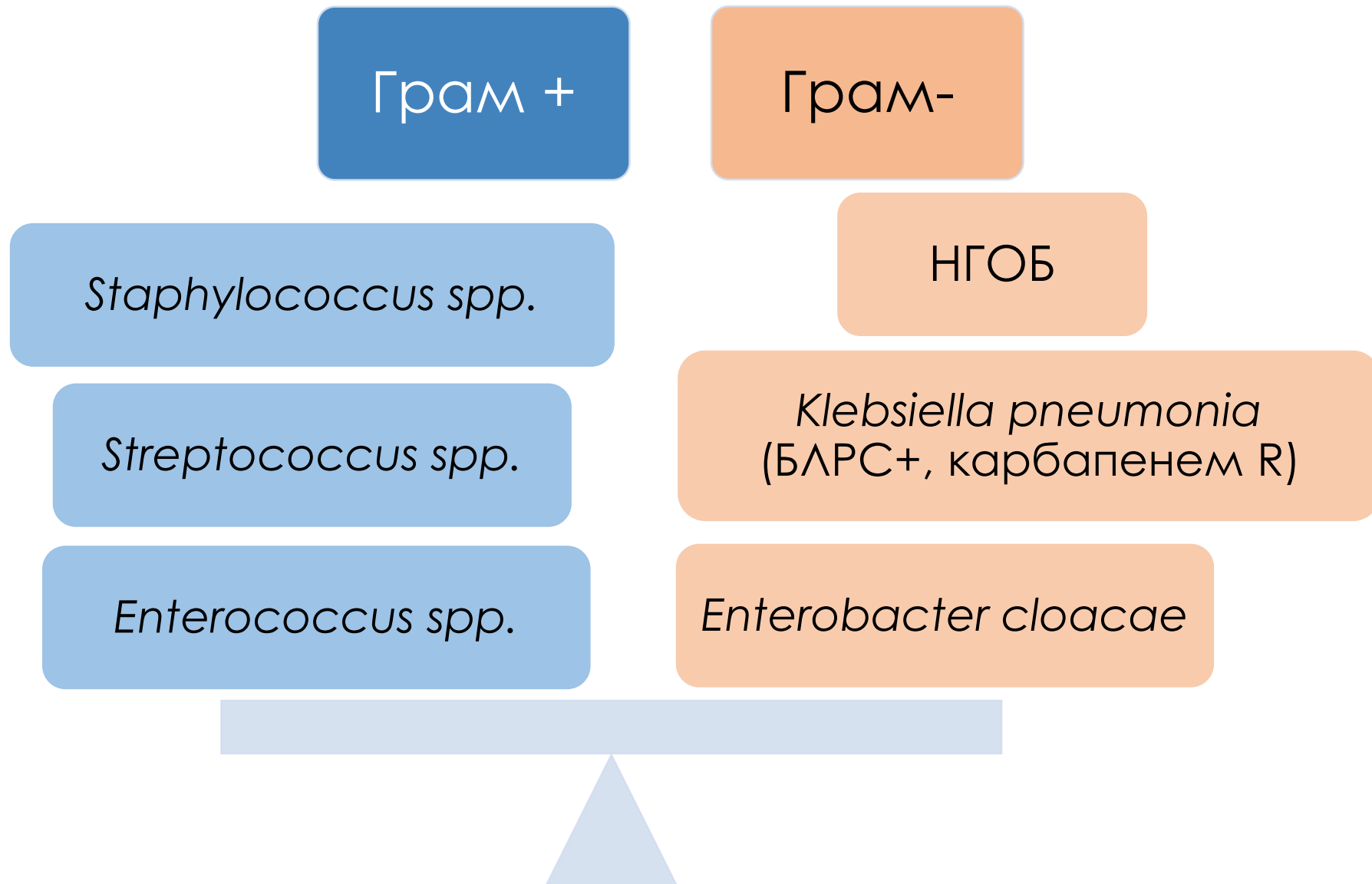
доказательство механизма развития септического состояния

обоснование выбора схемы антибиотикотерапии

оценка эффективности терапии



Особенности современной этиологии септических состояний



Этиология сепсиса в зависимости от локализации первичного очага



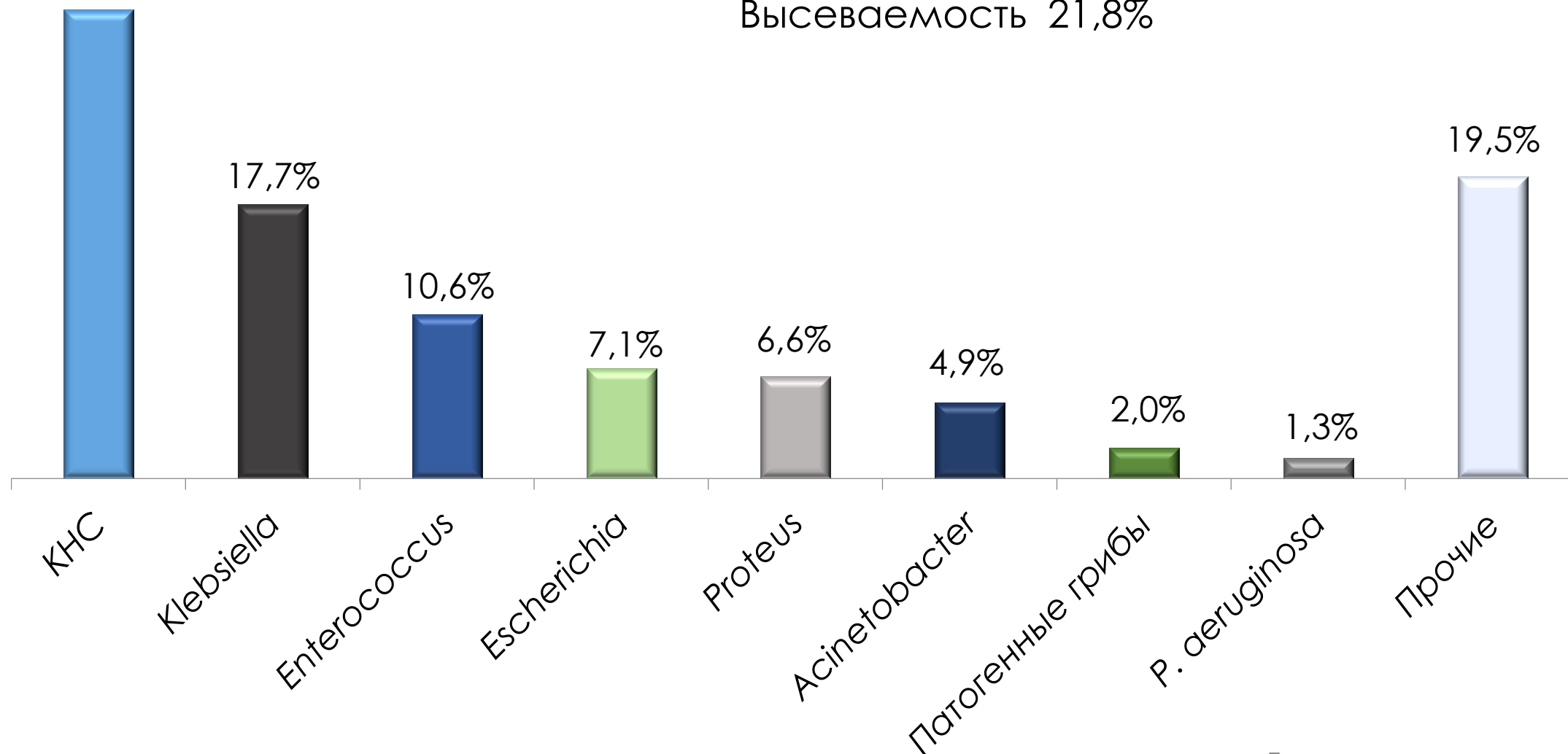
Предположительная этиология сепсиса в зависимости от локализации первичного очага	Локализация первичного очага
Легкие (нозокомиальная пневмония, развившаяся вне ОРИТ)	<i>S. pneumoniae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Klebsiella</i> spp., <i>E.coli</i>) <i>S. aureus</i>
Легкие (нозокомиальная пневмония, развившаяся в ОРИТ)	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> . <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Acinetobacter</i> spp.
Брюшная полость	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Bacteroides</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.
Кожа и мягкие ткани	<i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus</i> spp. <i>Enterobacteriaceae</i>
Почки	<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>E.coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Proteus</i> spp.) <i>Enterococcus</i> spp.
Ротоглотка и синусы	<i>Streptococcus</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. Анаэробы (<i>Peptostreptococcus</i> spp.)
После спленэктомии	<i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i>
Внутривенный катетер	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> ; Реже – <i>Enterococcus</i> spp., <i>Candida</i> spp

Спектр микроорганизмов, выделенных из крови

30,3%

2016г. гемокультур – 2 841, положительных – 618 проб

Высеваемость 21,8%



От чего зависит высеваемость?



1. Когда брать кровь для посева?
2. Как отбирать кровь для посева?
3. Какую среду использовать?
4. Какой объем крови?
5. Сколько флаконов для посева использовать?
6. Сколько дней инкубировать?
7. Контаминация или истинный возбудитель?



Сроки взятия крови для посева



Как можно раньше после появления
клинических симптомов

До назначения антибактериальной
терапии

Если антибиотикотерапия начата-
непосредственно перед введением
следующей дозы антибиотика



Как избежать контаминации?



Подготовить
всё
необходимое
Проверить
срок годности



Дезинфекция
рук
персонала
Дезинфекция
флакона
Одноразовые
перчатки
Экспозиция



Дезинфекция
места
венепункции
Экспозиция



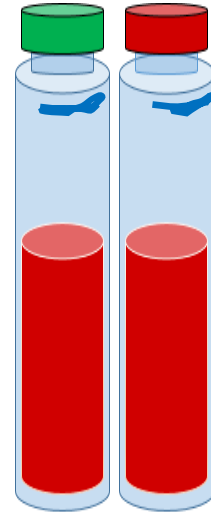
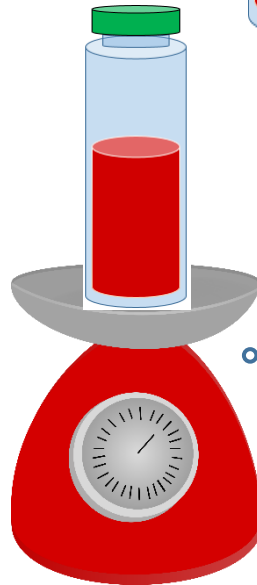
Применение
устройств
типа
«бабочка»
NB! Первым
наполняют
аэробный
флакон



Только
вертикальное
расположение
флаконов с
пробами
NB! Первым
наполняют
анаэробный
флакон

Какой объем пробы оптимален? Как контролировать объем?

- Взрослые и дети старше 12 лет:
от 20 до 30 мл в одной пробе
- Соотношение образца со средой 1:5 – 1:10



Нарисуйте
метки
на флаконах

Взвесьте образец
до и после...



Какой объем крови необходим для исследования у детей?

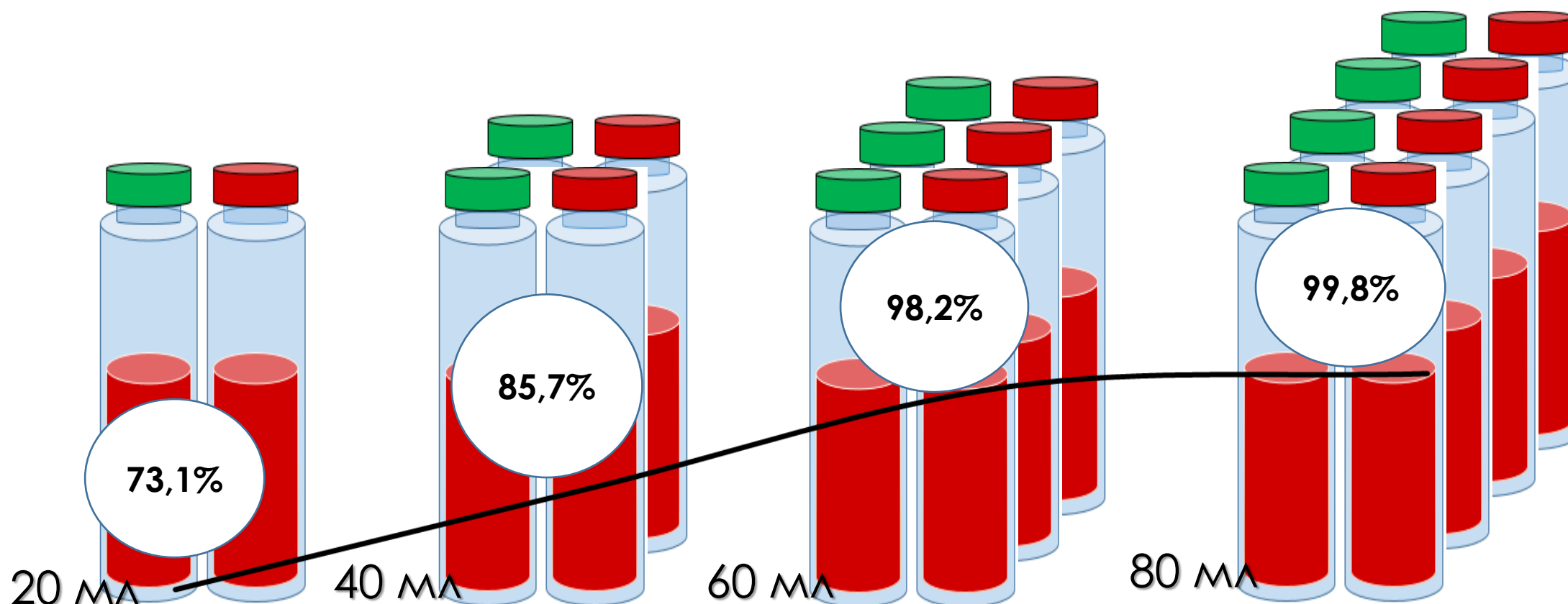


Вес (кг)	Рекомендуемый объем для культуры крови (мл)		Всего объем крови для исследования (мл)	% от общего объема крови
	Культура №1	Культура №2		
≤ 1	2	-	2	4
1,1-2	2	2	4	4
2,1-12,7	4	2	6	3
12,8-36,3	10	10	20	2,5
> 36,3	20-30	20-30	40-60	1,8- 2,7

Сколько проб крови необходимо собирать?



Кумулятивный процент высеваемости, связанный с количеством проб



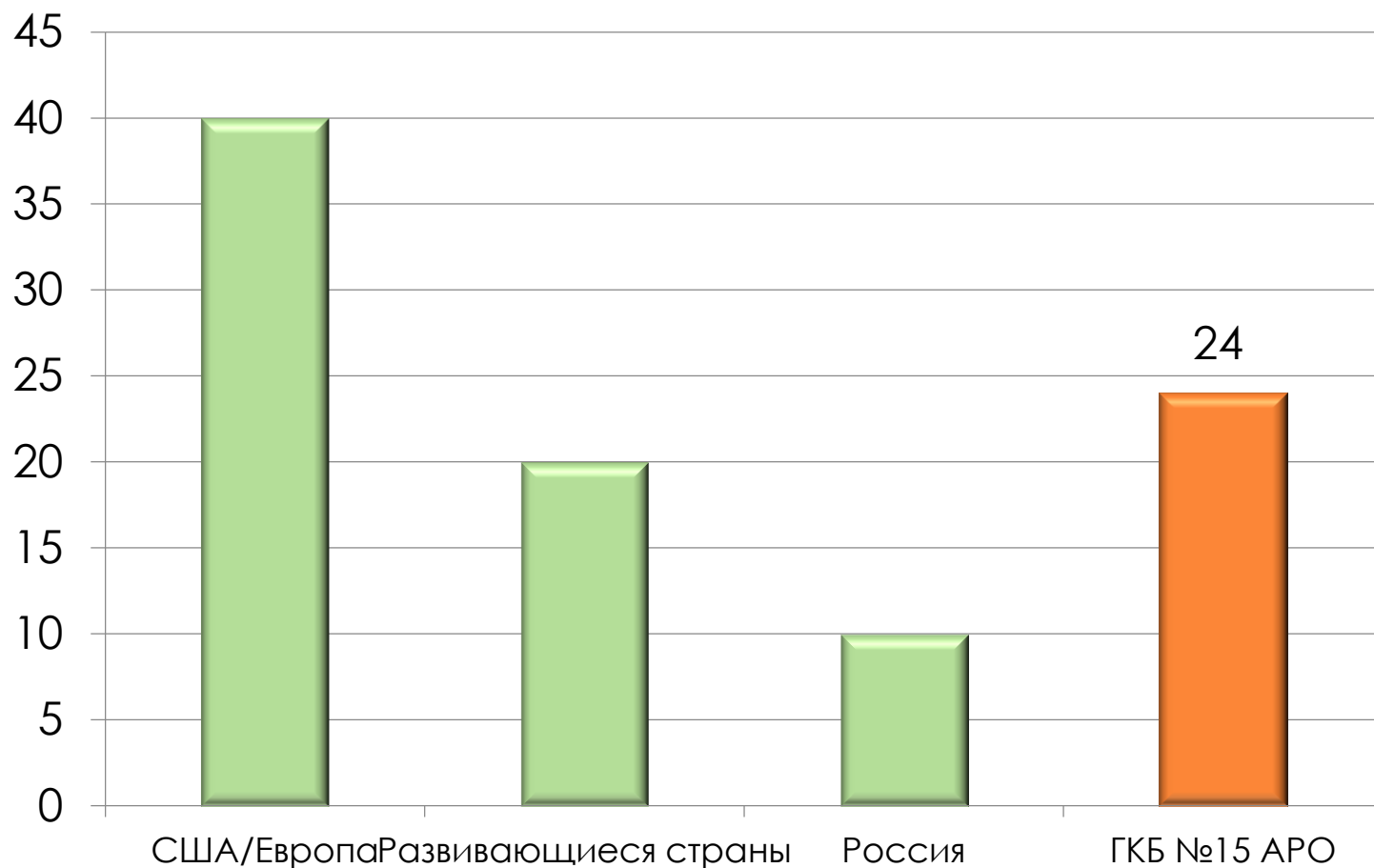
Lee A, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP. 2007

Detection of bloodstream infections in adults: how many cultures are needed? J Clin Microbiol 45:3546–3548.

Количество проб крови



НЕДОСТАТОЧНОЕ ГЕМОКУЛЬТИВИРОВАНИЕ!



Наборы на койку



Рекомендуемое количество комплектов флаконов посева крови



Взять кровь в 2 или 3 комплекта флаконов (аэробный + анаэробный) при каждом эпизоде подозрения на сепсис



Если результат остается отрицательным спустя 24 часа инкубации, а у пациента все ещё сохраняется септическое состояние



Взять кровь в 2 или 3 дополнительных комплекта флаконов (аэробный + анаэробный)



Если результат остается отрицательным спустя 24 часа инкубирования



При необходимости повторить протокол



Продолжить инкубирование



Провести обследование на немикробную этиологию

Транспортировка образца в лабораторию



Доставка в лабораторию – немедленно

Хранение зависит от типа флакона



Флаконы с бульоном для автоматизированных систем – при комнатной температуре, хранение более 48ч недопустимо



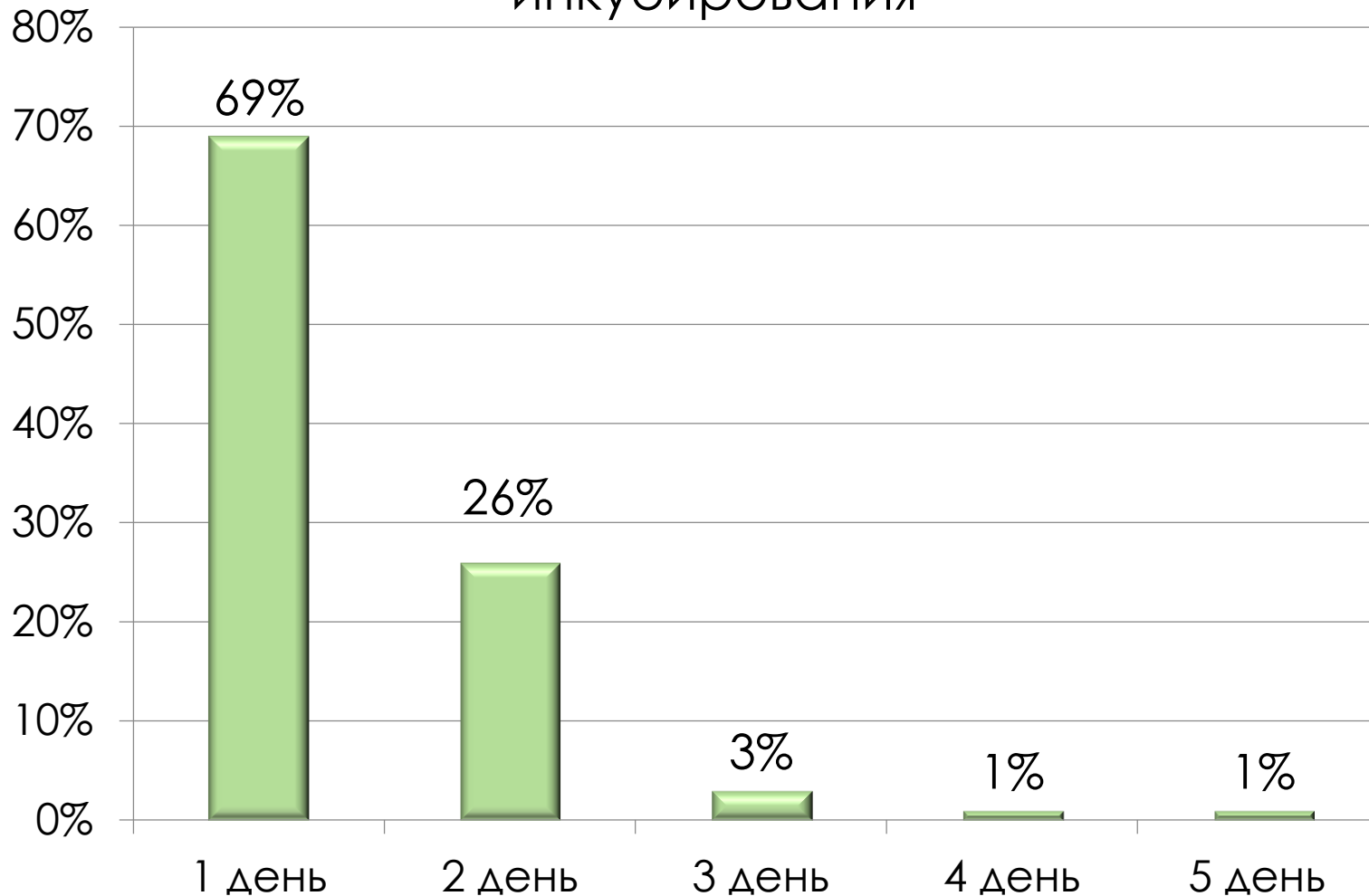
Флаконы для ручных методик – возможно начать инкубирование в термостате до момента доставки в лабораторию



Сколько дней инкубировать?



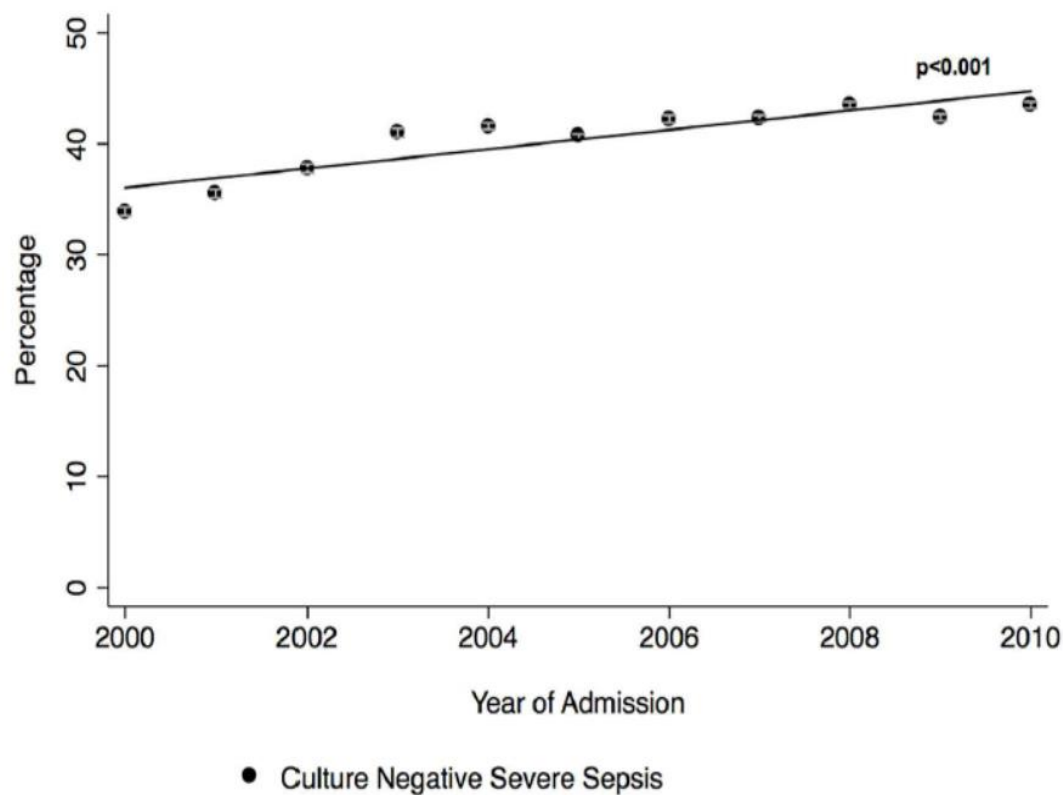
Количество значимых микроорганизмов по дням инкубирования



- 98% клинически значимых микроорганизмов были выделены в течение первых 3 дней инкубации
- 95%- в течение первых 2 дней инкубации



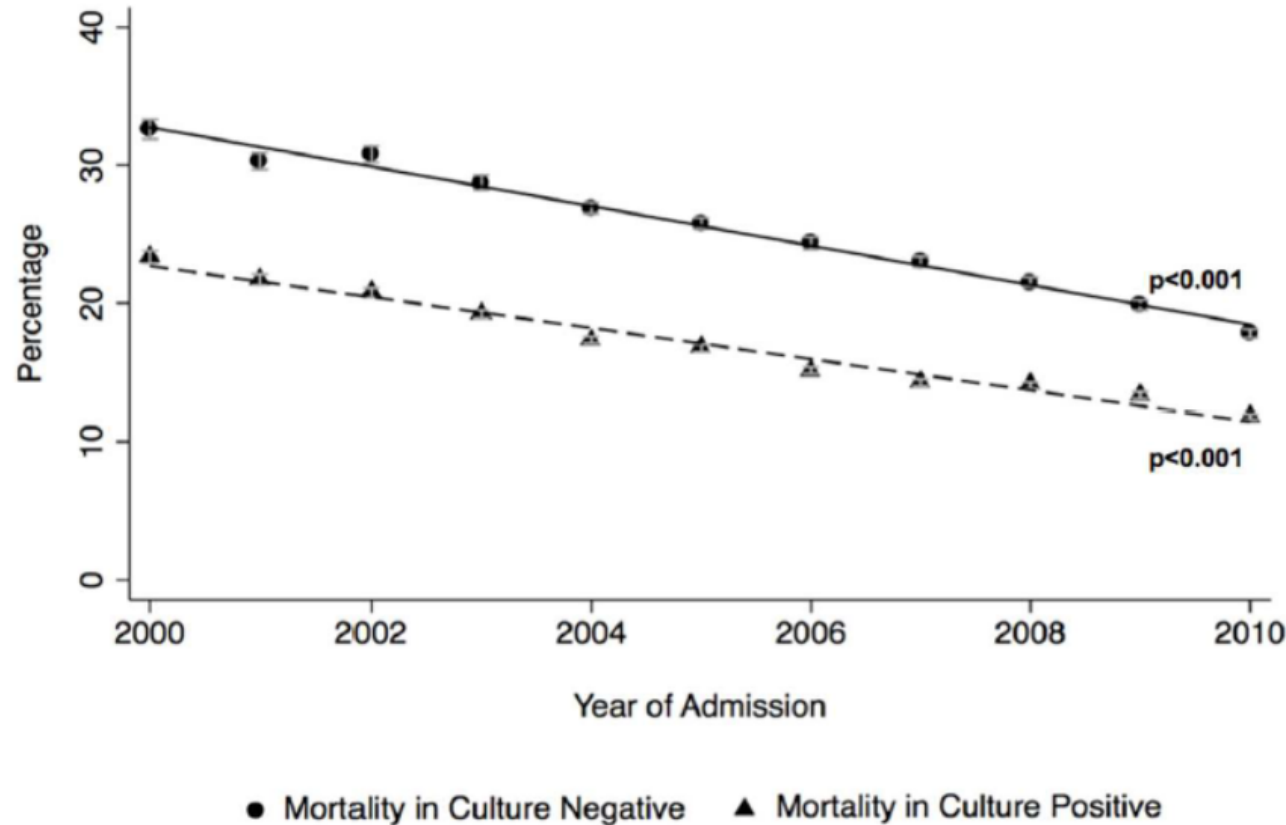
Тяжелый сепсис с отрицательной гемокультурой (CNSS)



- 28-49% случаев тяжелого сепсиса с отрицательными гемокультурами
- 6 843 279 – 3 226 406 (47,1%)- CNSS
- 2000- 33,9% случаев CNSS
2010- 43,5% случаев CNSS
- У пациентов с CNSS – больше сопутствующих заболеваний, острых дисфункций органов

Please cite this article as: Gupta S, Sakhuja A, Kumar G, McGrath E, Nanchal RS, Kashani KB, Culture Negative Severe Sepsis –Nationwide Trends and Outcomes, CHEST (2016), doi: 10.1016/j.chest.2016.08.1460.

Тяжелый сепсис с отрицательной гемокультурой (CNSS)



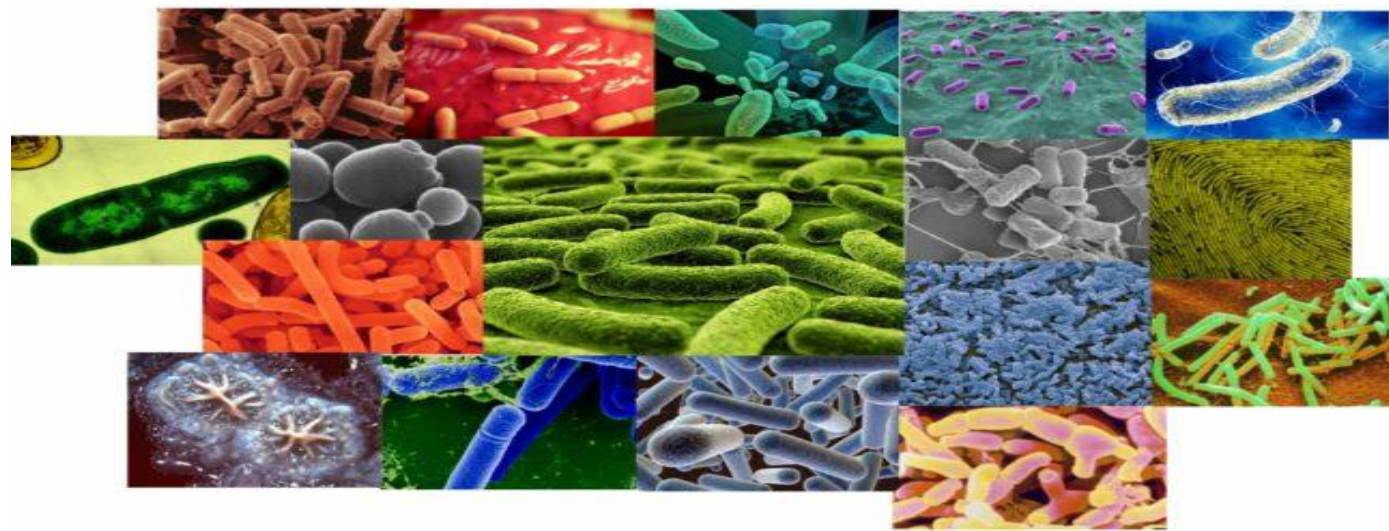
- Летальность
CNSS - 34,6%
CPSS - 22,7%
- Независимый
предсказатель
летальности

Please cite this article as: Gupta S, Sakhuja A, Kumar G, McGrath E, Nanchal RS, Kashani KB, Culture Negative Severe Sepsis –Nationwide Trends and Outcomes, CHEST (2016), doi: 10.1016/j.chest.2016.08.1460.

Возможные причины отрицательных гемокультур



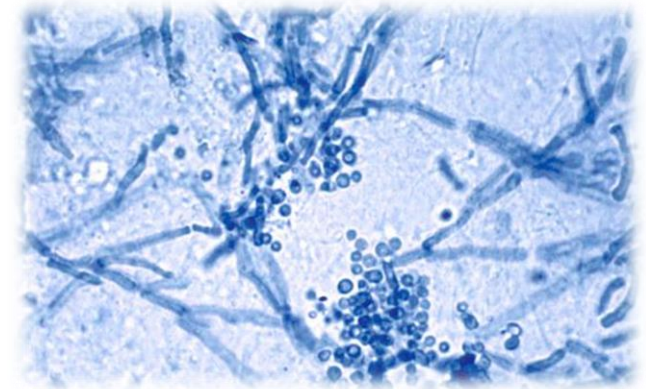
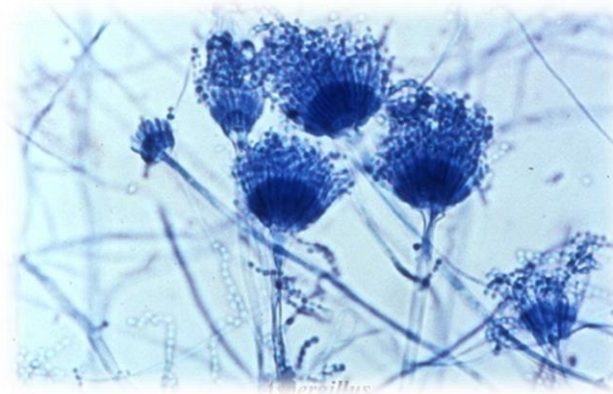
- *Anaplasma*, *Ehrlichia*
- *Bartonella* spp.
- *Borrelia* spp.
- *Brucella* spp.
- *Campylobacter* spp., *Helicobacter* spp.
- *Coxiella burnetii*
- *Francisella tularensis*
- *Legionella pneumophila*
- *Leptospira* spp.
- *Mycobacterium* spp.
- *Nocardia* spp.
- *Rickettsia* spp.



Фунгемии



- *Histoplasma capsulatum*
- *Coccidioides immitis*
- *Candida albicans*,
- *Cryptococcus neoformans*
- *Aspergillus* spp.
- *Blastomyces dermatitidis*
- *Candida nonalbicans*
- *Trichosporon beigelii*
- *Fusarium* spp.
- *Malessezia* spp. и др.





Известные факты:

- Наиболее высокая частота развития кандидемии регистрируется у пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии ОРИТ.
- Около 2/3 случаев первичных фунгемий, в том числе и среди пациентов в ОРИТ, связано с использованием центральных венозных катетеров
- Развитие фунгемии сопровождается высоким уровнем краткосрочной летальности. Приблизительная частота летальных исходов среди пациентов с фунгемией превышает 55%, а показатель атрибутивной летальности составляет около 38%.
- Повторное обнаружение *Candida spp.* в последовательных образцах материала, взятого из разных локусов, является важным, если не обязательным, предшественником развития в последующем фунгемии.
- Грибы могут вызывать развитие тяжелых инфекций при длительном использовании сосудистых катетеров.
- При выделении из крови *Candida spp.* требуется немедленно удалить все центральные венозные катетеры
- Инфекции, вызванные *Candida spp.*, в том числе кандидемия, могут возникать в результате передачи возбудителя через руки медицинского персонала, колонизированного кандидами.

Катетер- ассоциированные инфекции кровотока (КАИК)



- Третье место среди всех ИСМП в стационаре
- Первое место среди причин bacterиeмии

Этиология

Степени тяжести пациента

- Типа катетера
- Профиля отделения
- Пути инфицирования



Зависимость этиологии КАИК от профиля отделения и клинических характеристик



Условия использования ЦВК	Специфическая микрофлора	Другие микроорганизмы
Отделение общего профиля	Грам (+) кокки (> 60%)	MRSA (5-30%)
ОРИТ	Грам (-) бактерии (30-40%) KHC, MRSA (~30%)	
Иммуносупрессивное состояние	KHC (> 50%)	<i>S. aureus</i> (~20%)
Полное парентеральное питание	<i>S. aureus</i> (> 30%)	KHC (~20%) <i>Candida spp</i> (~10%)

Микробиологические методы диагностики КАИК



Прямая микроскопия

Культуральное исследование мазков отделяемого в месте установленного катетера

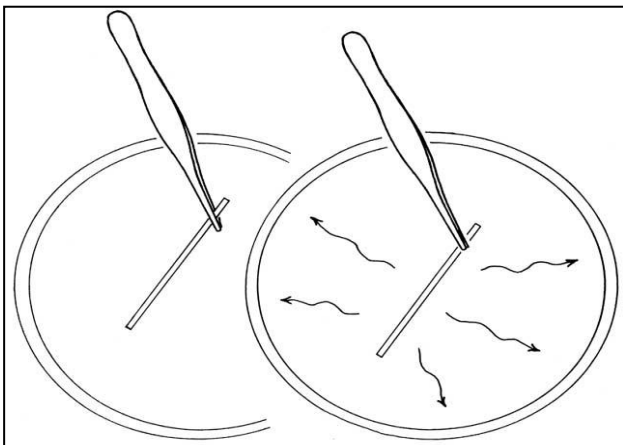
Культуральные методы исследования удаленного катетера (полуколичественный и количественный)

Метод одновременного посева крови из катетера и из периферической вены

Оценка роста микроорганизмов по методу D. Маки (полуколичественный метод)



Гемокультура	Количество колоний при исследовании катетера	Вывод
Положительная	> 15 КОЕ	Катетер является источником инфекции кровотока
	< 15 КОЕ	Микробное обсеменение катетера гематогенным путем
Отрицательная	> 15 КОЕ	Катетер инфицирован, не исключается транзиторная бактериемия
	< 15 КОЕ	Катетер колонизирован



Четырехкратное прокатывание дистального фрагмента (длиной 5-7 см) извлеченного катетера по поверхности плотной питательной среды 5% кровяной агар с последующей инкубацией 35-37° С в течение 48-72 часов предпочтительно в CO₂ инкубаторе

Чувствительность – 92%
Специфичность- 83%

Диагностика КАИК без удаления катетера



Количественный метод парных гемокультур

- ЦВК+ периферическая вена
- Один и тот же микроорганизм
- Соотношение обсемененности из катетера и вены ≥ 5 –источник инфекции
 - Чувствительность – 94%
 - Специфичность- 100%

Неколичественный метод парных гемокультур

- Определение дифференциального времени до положительного результата из ЦВК и периферической вены
- Только для анализаторов гемокультур
- Диагностическое значение-разница в 2 ч
 - Чувствительность – 91 / 94%
 - Специфичность- 94 / 89%

Этиология инфекционного эндокардита



- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococci* группы «viridans»

85%



- *Enterococci*
- *Staphylococci* CN

10%

- Enterobacteriaceae
- *Candida*

- Группа HACEK
- Другие редкие

5%

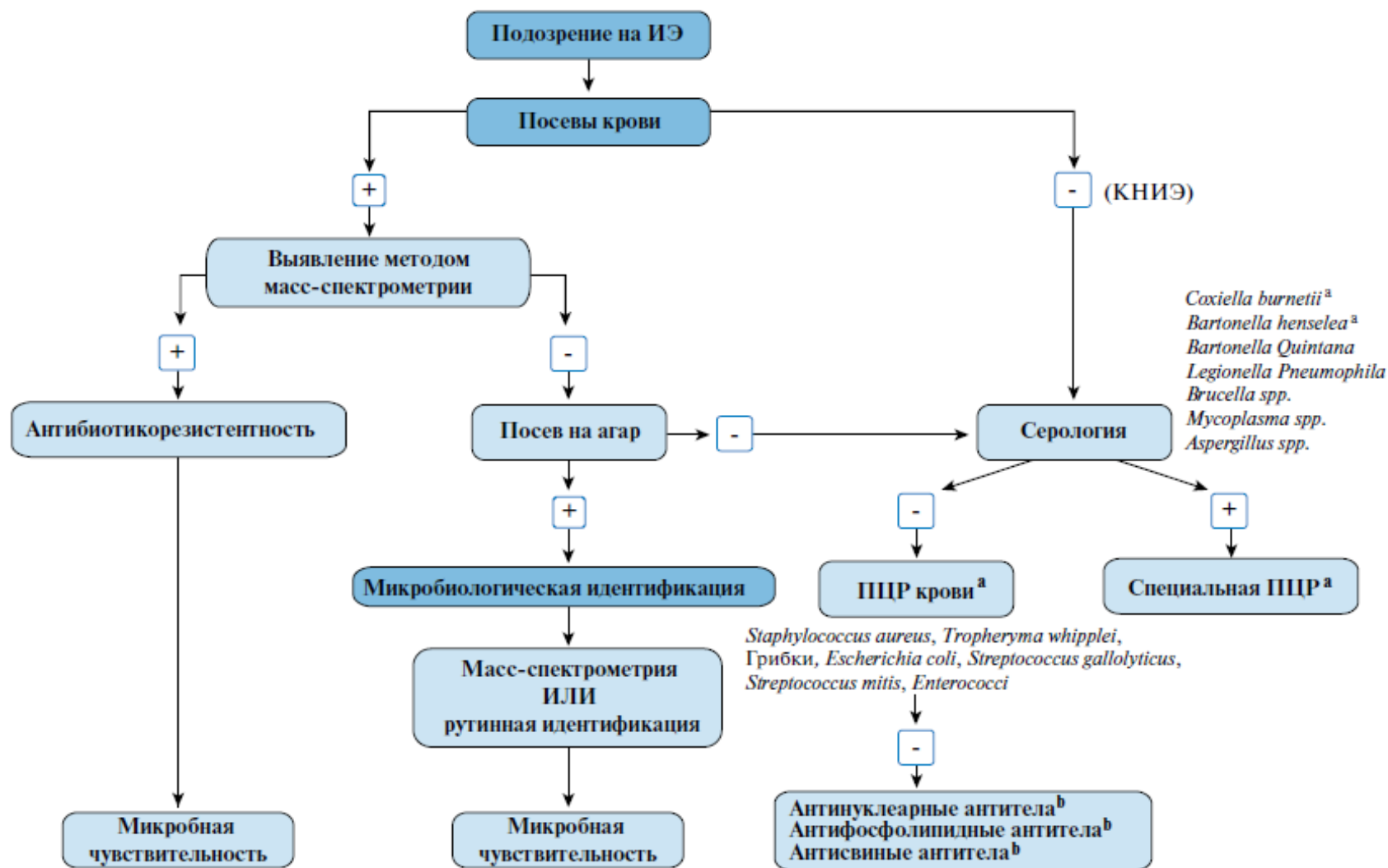
Haemophilus (*H. parainfluenzae*
H. aphrophilus)

Actinobacillus actinimycetemcomitans,
Cardiobacterium hominis,
Eikenella corrodens,
Kingella kingae

-высокий тропизм к эндокарду сердца.
-общая особенность- трудности в диагностике
(бактерии группы HACEK с трудом культивируются на питательных средах)

Сочетание нескольких инфекционных агентов (смешанная форма). Регистрируется редко и ведет, как правило, к тяжелому затяжному течению болезни

Микробиологическая диагностика при культуropозитивном и культуroneгативном ИЭ



Рекомендации ESC
по ведению больных
с инфекционным
эндокардитом 2015

Рабочая группа по
ведению инфекционного
эндокардита
Европейского общества
кардиологов (ESC)

Российский
кардиологический
журнал №5(133) 2016

Рис. 2. Микробиологическая диагностика при культуropозитивном и культуroneгативном ИЭ.

Примечание: ^а — опытная микробиологическая лаборатория, ^б — иммунологическая лаборатория.

Сокращения: КНИЭ — культуroneгативный эндокардит, ИЭ — инфекционный эндокардит, ПЦР — полимеразная цепная реакция.

Микробиологическая диагностика



Требования времени

- Быстрая микробиология

Взгляд в будущее

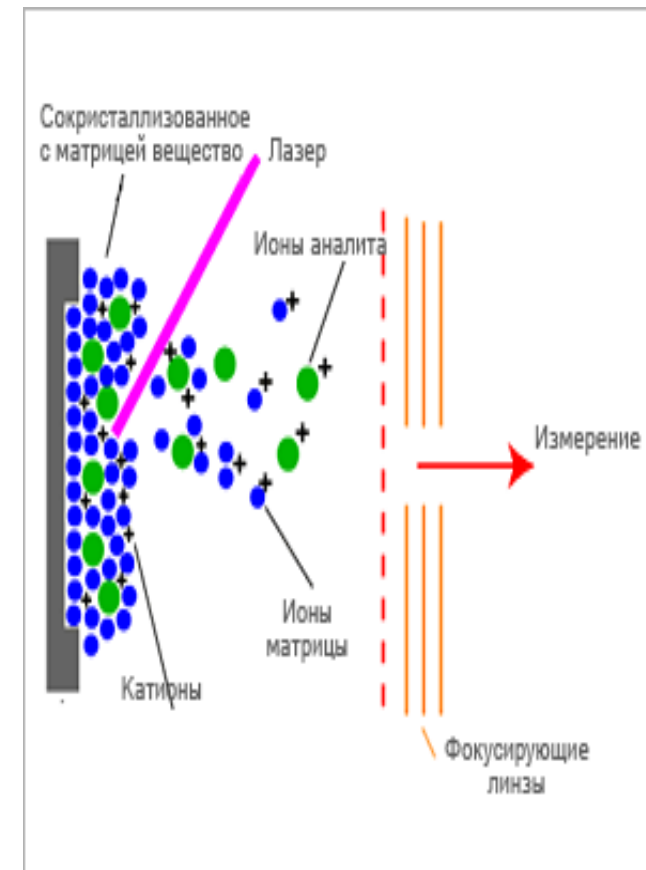
- Усовершенствование культуральных исследований
- Исследование расширяющегося множества технологий для микробиологической диагностики

Прямая идентификация из положительного образца гемокультуры- MALDI-TOF



- Бактерии в кровотоке - $< 1-10$ КОЕ/мл
- После гемокультивирования - 10^6-10^8 КОЕ/мл (чистая культура)
- Необходима экстракция! Несколько видов протоколов

NB! Идентификация может быть затруднена из-за присутствия компонентов культуральной среды!



Генетические методы диагностики бактериемий



Принцип метода основан на гибридизации участка целевой цепи ДНК и зонда ПЦР
Гибридизация на ДНК-чипе

Достоинства

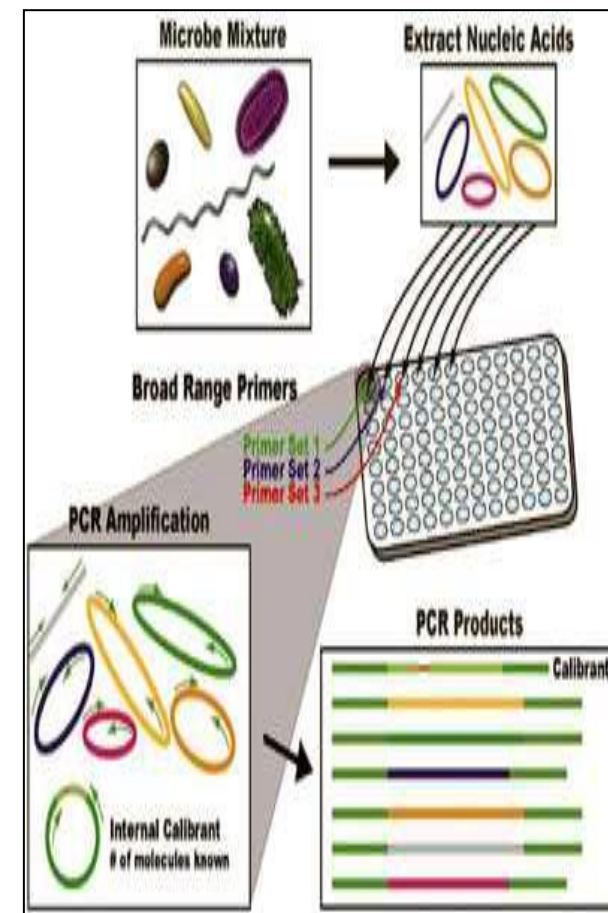
Недостатки

Быстрота

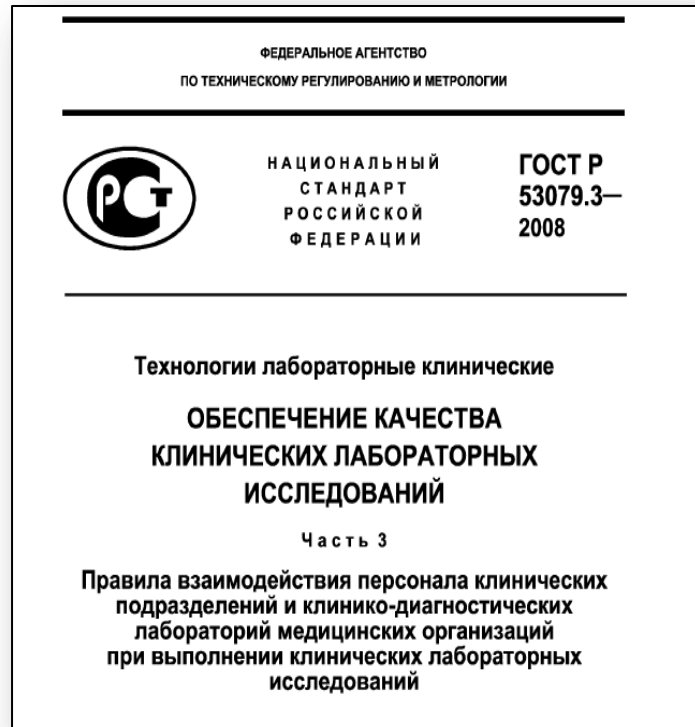
Сложность экстракции неповрежденной бактериальной ДНК

Специфичность

Сложность интерпретации результатов



Позитивный флакон. Первые действия – микроскопия и информирование клинических специалистов



ГОСТ Р 53079.3—2008

Т а б л и ц а 1 — Лабораторные исследования, выполняемые по жизненным показаниям, и критические значения результатов лабораторных анализов, требующие немедленных действий

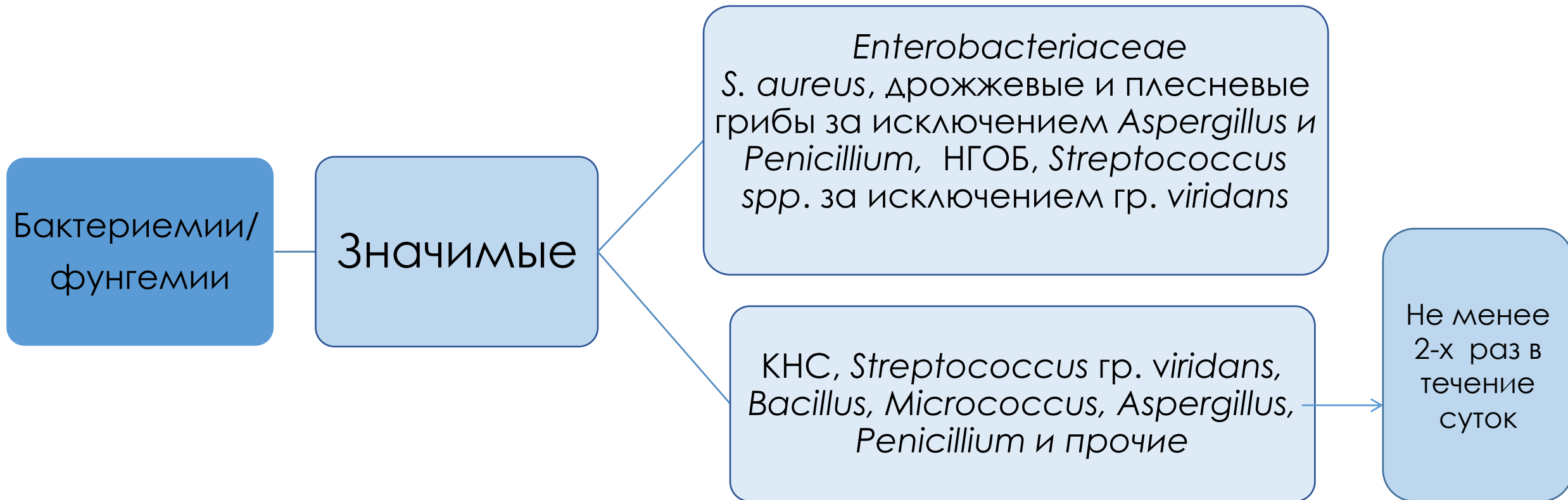
Показатель	Критическое значение
------------	----------------------

Микробиология	
Культура крови	положительная
Окраска по Граму ликвора и других жидкостей (плевральной, синовиальной)	положительная

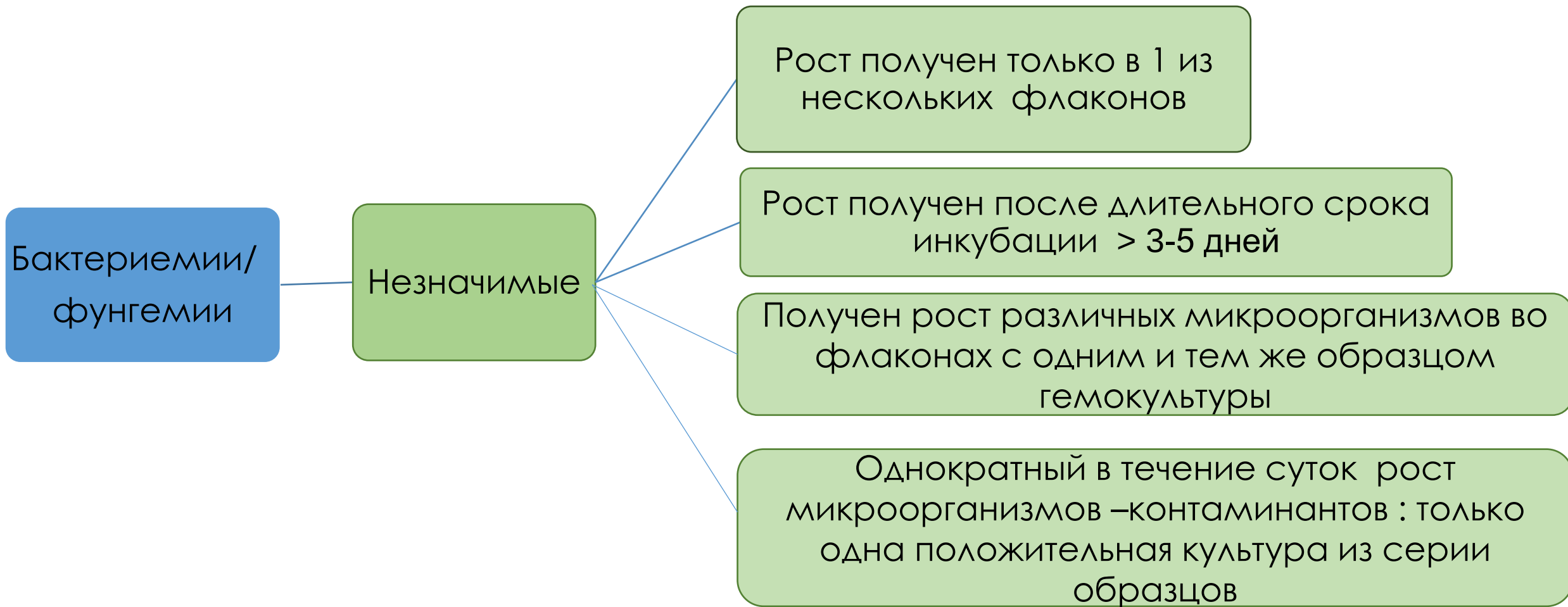
4.7.3 Критические значения результатов лабораторных анализов, выполняемых по жизненным показаниям

При получении в лаборатории значений результатов лабораторных исследований, отражающих изменения деятельности физиологических систем, угрожающие жизни пациента (таблица 1), лабораторный персонал должен немедленно информировать об этом клинический персонал для принятия необходимых мер лечения.

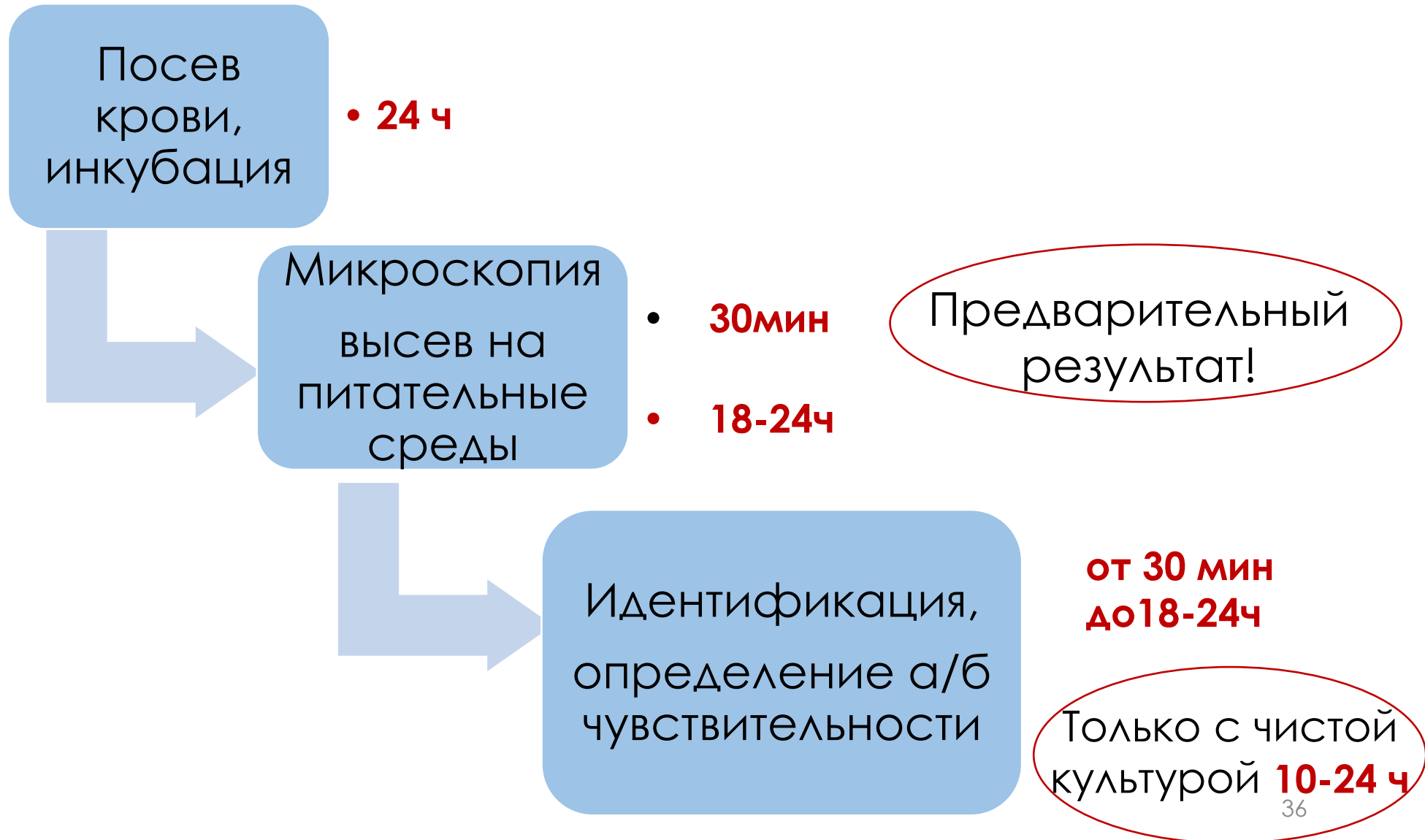
Критерии оценки клинической значимости результатов диагностики бактериемии



Критерии оценки клинической значимости результатов диагностики бактериемии



Алгоритм работы с положительной гемокультурой



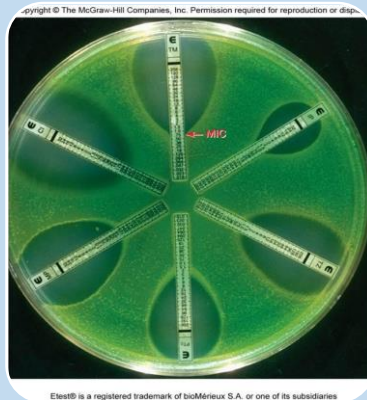
Определение антибиотикограммы после выделения чистой культуры



ДДМ

16-20 ч

Окончательный
результат не
ранее
24ч



Е-тест
(МПК)

16-20ч

(для
требуемых
микроорганизмов
до 24ч)



iEMS-Reader
(break-
point)
18-24ч



Phoenix
(break-
point)
9-12ч

Алгоритм интерпретации результатов



2 и более позитивных флаконов

1 позитивный флакон

Монокультура
+
клинические
симптомы

Инфекция
кровотока

Микст-культура +
интраабдоминальные
инфекции,
иммунокомпромети-
ро-ванные пациенты,
посттрансплантация

Возможно
инфекция
кровотока

Salmonella,
Brucella,
S. aureus,
P. aeruginosa,
E.coli, *Listeria*...

Возможно
инфекция
кровотока

Propionebacterium
Corynebacterium,
Bacillus, CoNS

Возможно
контаминация

CoNS, *Viridans* group
стрептококки
+
Наличие внедренных
интраваскулярных
устройств, протезы
клапанов сердца и
т.д.

Возможно
инфекция
кровотока

Отрицательная
гемокультура

Повторить гемокультивирование

Поиск небактериальных патогенов или
других причин клинических симптомов



Диагностика бактериемий /фунгемий/