ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР КОЛЛЕГИИ ВЕТЕРИНАРНЫХ СПЕЦИАЛИСТОВ

EDUVET.RU

Мазки и посевы: как брать, как интерпретировать?

Елизавета Лежнева

Ветеринарный врач отделения интенсивной терапии
Ветеринарная клиника «Белый Клык»

белый клык
ветеринарная клиника

Что брать?

- ТИАБ наиболее вероятных источников – очаги в легких, желчь, содержимое кист и абсцессов, трахеальные смывы и БАЛ
- Выпоты
- Мочу
- Кровь

JUST DO IT

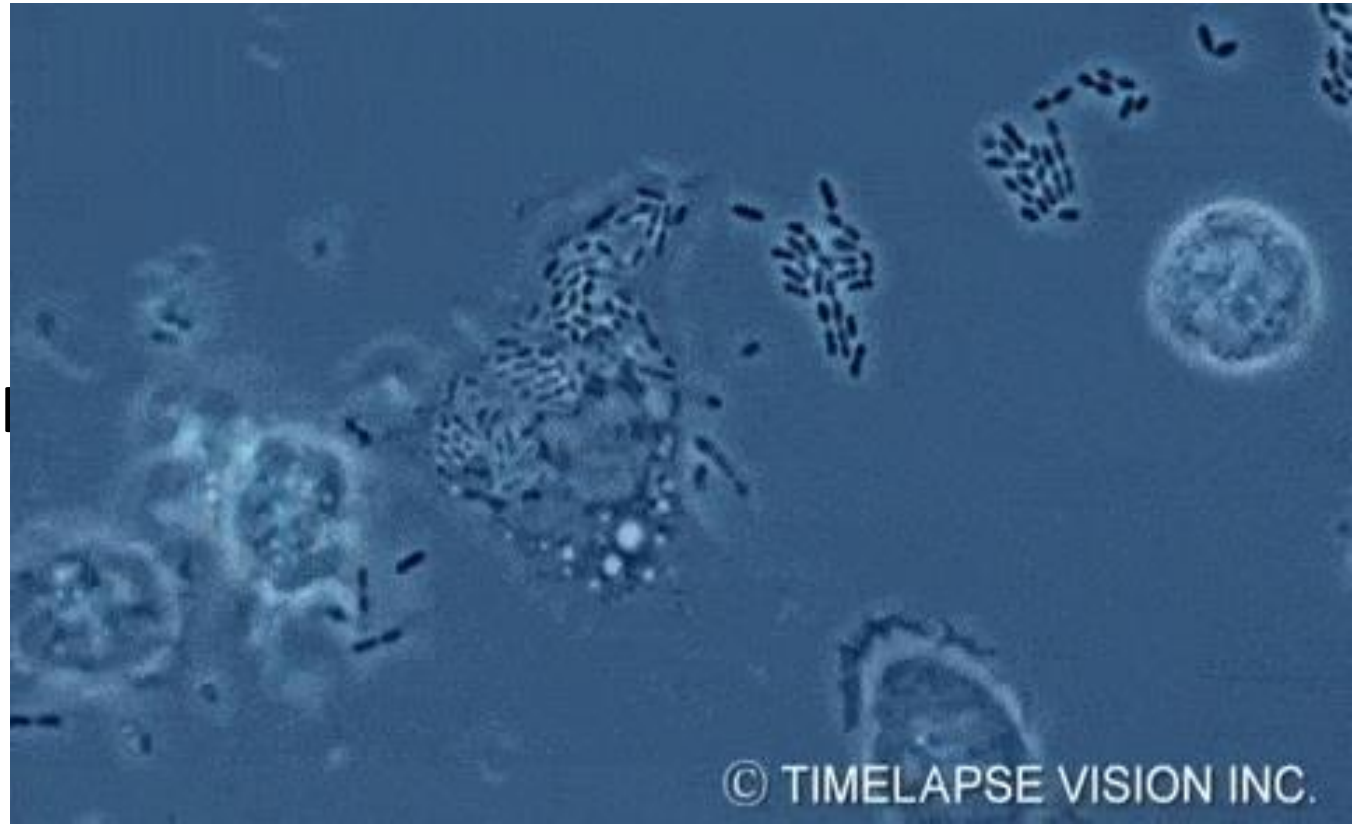
Брать или не брать? - Посев

ДА	Скорее НЕТ
• Пациент получал/получает АБТ • Пациент в тяжелом/критическом состоянии • «Труднодоступная» локализация • Нет ответа на применяемый АМП • Вы энтузиаст микробиологии и эпидемиологии ☺	• Инфекция с предсказуемой чувствительностью – ? • Множественная бактериальная инфекция с высоко вероятной колонизацией

Клиническое исследование

- Важен:
  - Цитоз / осадок
  - Глюкоза и лактат
  - Бактерии и фагоцитозы
  - Окраска по Граму!

  - Не все кокки Гр+, а палочки Гр –



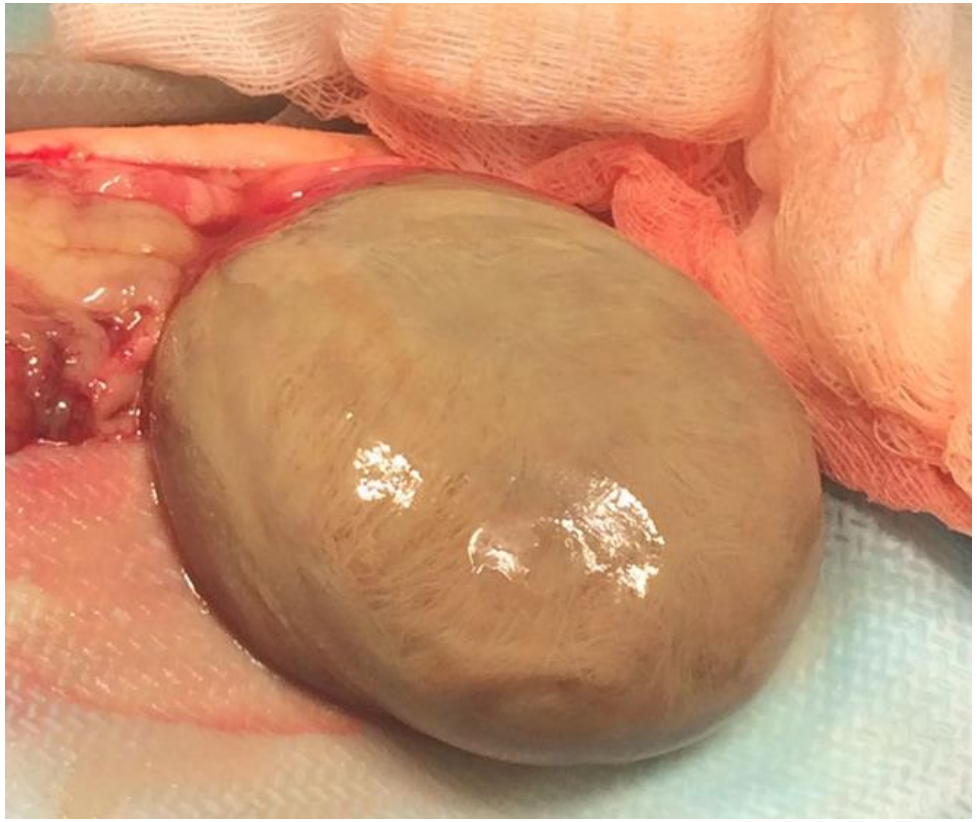
Перитониты

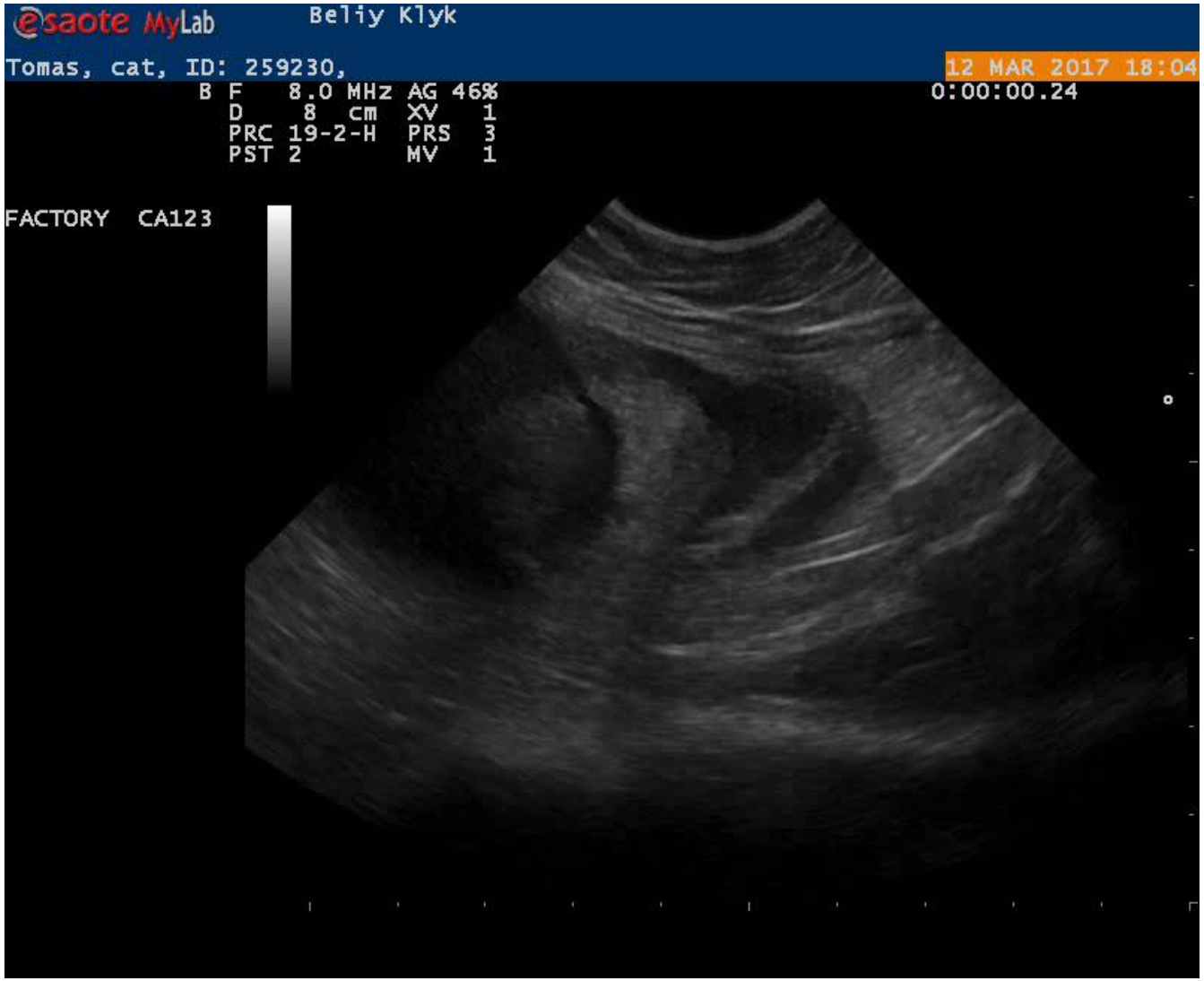
- Вторичные
  - Есть бактериальная утечка их дефекта ЖКТ, пиометры, МВП, желчного пузыря или травмы брюшной стенки
- Первичные
  - Утечки не обнаруживается
  - Источник остается неизвестен
  - Воспаленный ЖКТ или МВП

- Всегда пунктировать и исследовать свободную жидкость
- Бактерии в мазке обнаруживают только в 50-90% случаев
- Для остального - посев!

Primary bacterial peritonitis in dogs and cats: 24 cases (1990–2006) William T. N. Culp, *J Am Vet Med Assoc* 2009;234:906–913
Underlying cause, pathophysiologic abnormalities, and response to treatment in cats with septic peritonitis: 51 cases (1990–2001) Merilee F. Costello, J Am Vet Med Assoc 2004;225:897–902

Моча

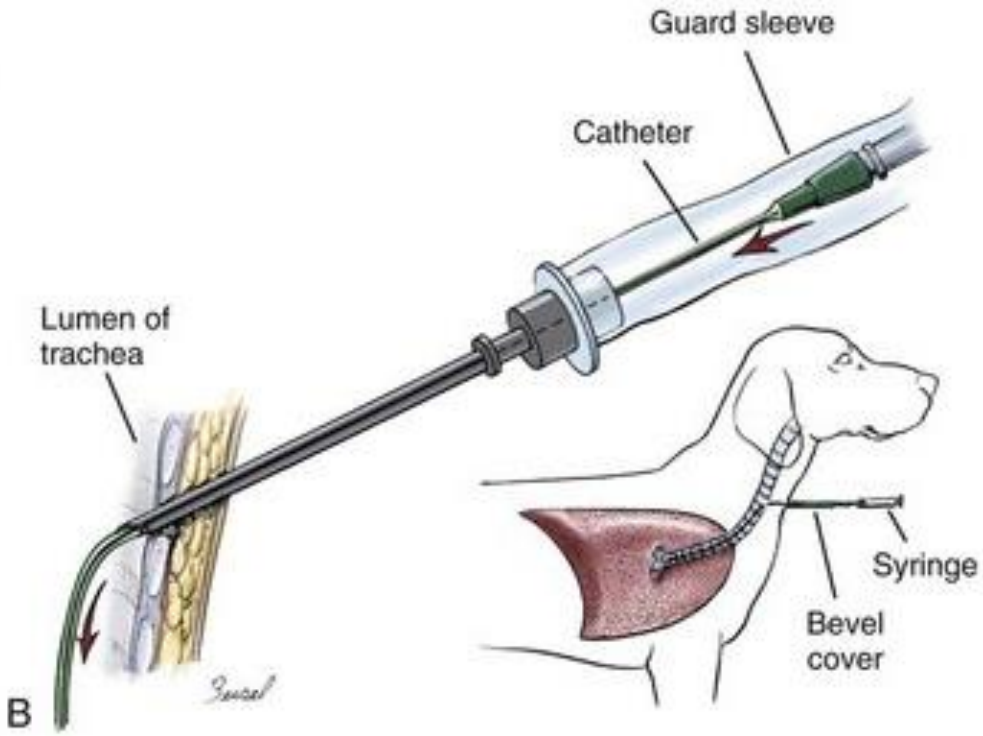




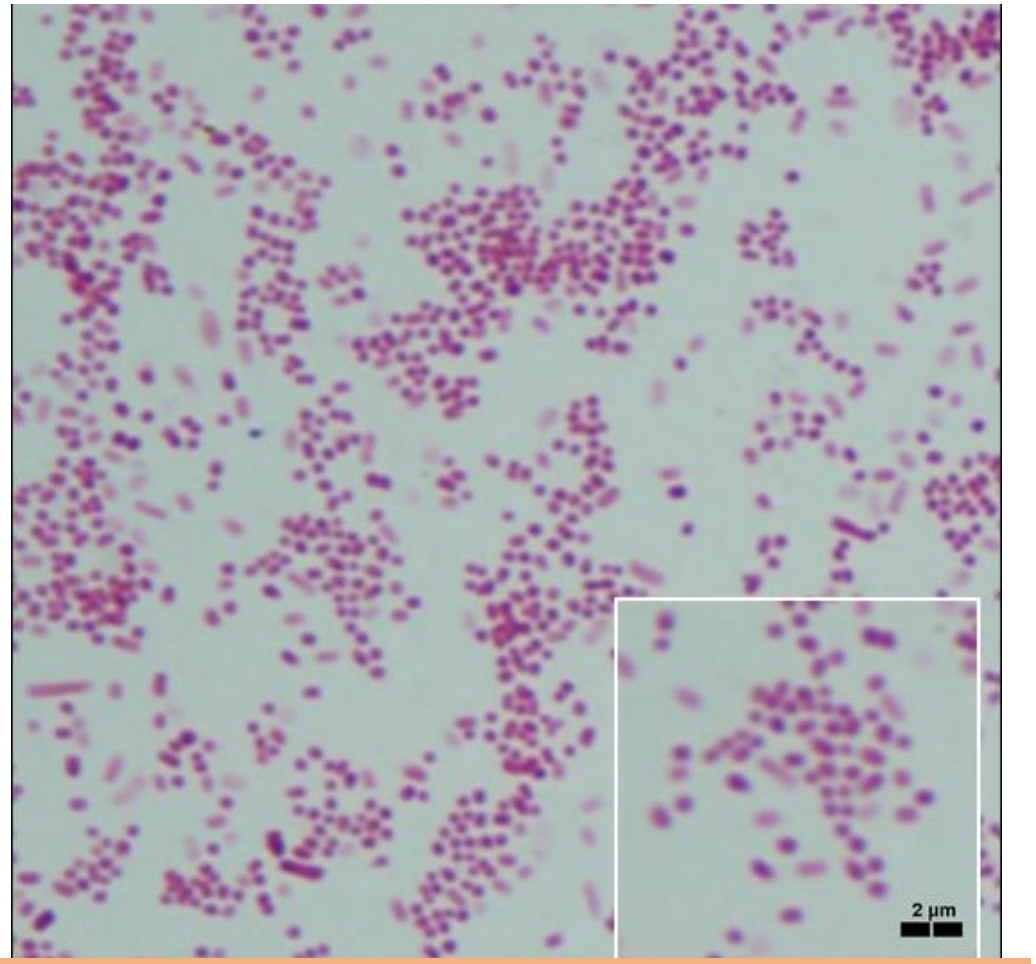
- Рутинный анализ мочи и посев

Пневмонии

- Транстрахеальный или эндотрахеальный смыв
- Бронхоальвеолярный лаваж
- ТИАБ очаговых поражений легких



Пиоторакс



Микробиологический анализ на анаэробы

Интерпретация - Посевы

- Вид микроорганизма – чаще всего условно-патогенный
- Стерильные среды – инфекция
- Нестерильные – колонизация?
- Количество КОЕ – диагностический титр 10<3, важен вид анализа
- Чувствительность к антибиотикам – исследование in vitro ≠ in vivo

Посевы врут?!

- Бактерии – нежные существа
- Важно соблюдение стандартных условий при культивировании
- Отличие действия АБ in vivo и in vitro
- Образование биопленок

Залог успеха

- До начала антибиотикотерапии
- Соблюдение требований лаборатории:
  - Согреть транспортную среду до забора материала
  - Взять строго необходимое количество материала
  - Поместить в холодильник сразу же
  - Быстро доставить в лабораторию
- Посев биопленок – отправлять на анализ уролиты, фрагменты слизистой, грануляций, капсул абсцессов, катетеров и т.п.
- Гной – это мертвые микробы!

Минимальная ингибирующая концентрация

- Концентрация, подавляющая рост (не обязательно убивающая!!!) МКО in vitro
- Границы МИК определяются рекомендованными дозами антибиотиков и популяционной устойчивостью МКО

Градация чувствительности МКО

- *Чувствителен – S (susceptible)*
- *Малочувствителен – I (intermediate)*
- *Резистентен – R (resistant)*

У - выделенная культура устойчива, **УЧ** - умеренно чувствительна, **Ч** - чувствительна, **ВЧ** - высокочувствительна, **СЧ** - слабочувствительна, **НИ** - не исследовалось.

Параметр	Чувствительность	Параметр	Чувствительность
Бензилпенициллин	ВЧ	Левомицетин	ВЧ
Ампициллин	ВЧ	Рифампицин	ВЧ
Оксациллин	У	Канамицин	СЧ
Цефазолин	Ч	Неомицин	Ч
Цефотаксим	ВЧ	Гентамицин	СЧ
Цефтриаксон	ВЧ	Тобрамицин	СЧ
Цефоперазон	Ч	Фурадонин	ВЧ
Цефалексин	СЧ	Фурагин	ВЧ
Цефиксим	ВЧ	Ципрофлоксацин	ВЧ
Ванкомицин	ВЧ	Офлоксацин	ВЧ
Фузидин	ВЧ	Рокситромицин	У
Линкомицин	У	Кларитромицин	У
Клиндамицин	У	Имипенем	У
Олеандомицин	У	Налидиксовая кислота	СЧ
Эритромицин	У	Норфлоксацин	ВЧ
Азитромицин	У	Энрофлоксацин	ВЧ
Доксициклин	Ч	Пефлоксацин	ВЧ

Прочее: В результате бактериологического исследования выделена культура
Pseudomonas aeruginosa 1×10^6 КОЕ/мл
Enterococcus faecium 1×10^2 КОЕ/мл

Алгоритм интерпретации посева

- Вид – патоген или нет, контаминант?
  - Есть своя флора?
  - Результаты клинического исследования?
- Количество КОЕ
  - Диагностический титр
  - Характер роста:
  - медленный рост, требующий активного культивирования из легко контаминируемого мазка – колонизация;
  - быстро растущие МКО – скорее инфекция, наоборот - >3 возбудителей – колонизация
- Природная и вероятная приобретенная резистентность?

Кто в зверушке живет?

Грам + кокки

Гр +

- Staphylococcus pseudointermedius, intermedius, aureus, haemolyticus
  - Метициллин-чувствительные
  - Метициллин-резистентные
    S. aureus (MRSA) и S. pseudointermedius (MRSP)
- Streptococcus
  - Группы A, B, C и G
- Enterococcus
  - Ампициллин-чувствительные
  - Ампициллин-резистентные,
    ванкомицин-чувствительные
  - Ампициллин- и ванкомицинрезистентные (VRE)

Грам - палочки

Гр -

- Entorebacteriaceae.
  - Esherichia coli
  - Klebsiella sp.
  - Enterobacter sp.
  - Proteus
  - Salmonella sp.
  - Citrobacter freundii
- Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка)
- Acinetobacter baumanii
- Pasteurella sp.
- Bordetella sp.
- Moraxella sp.
- Bacteroides sp.
- Fusobacteria sp.

Грам - кокки

Гр -

- Brucella sp.

Грам + палочки

Гр +

- Clostridium sp.
- Actinomyces sp.
- Nocardia sp.
- Corynebacterium spp.

Слайд А.Ю. Павлюченко, дополненный

Интерпретация посева мочи

- Рост одного МКО <10^2 КОЕ/мл при цистоцентезе – контаминация
- Рост большого количества нескольких МКО – не исключена пункция кишечника
- Важна плотность мочи!

Assessment of Quantitative Urine Culture Results in Dogs and Cats

METHOD OF COLLECTION	SPECIES	SEX	COLONY COUNT INDICATIVE OF URINARY TRACT INFECTION
Cystocentesis*	Dog	Male	$>10^2$ cfu/mL
		Female	$>10^2$ cfu/mL
	Cat	Male	$>10^2$ cfu/mL
		Female	$>10^2$ cfu/mL
Catheterization	Dog	Male	$>10^3$ cfu/mL
		Female	$>10^5$ cfu/mL†
	Cat	Male	$>10^3$ cfu/mL
		Female	$>10^3$ cfu/mL
Midstream voided	Dog	Male	Unreliable‡
		Female	Unreliable‡
	Cat	Male	Unreliable‡
		Female	Unreliable‡

ISCAID Consensus Statement: Antimicrobial Guidelines for the Treatment of Urinary Tract Infections in Dogs and Cats

ACVIM 2016

- Бессимптомная бактериурия – подтверждена посевом, нет клинических симптомов ИМВП
- Моча собрана цистоцентезом
- Рост 10*4 и более КОЕ не исключает бессимтомную бактериурию

Собака, 5 лет, ОГЭ полгода назад, в анамнезе ИМВП 2 года назад. Жалобы на подтекание мочи. Общее состояние хорошее. УЗИ МВП – норма, ОАМ – норма. Посев мочи.

Посев

Коментарий :
Обнаружен гемолитический коагулаза - положительный Staphylococcus intermedius в количестве 2,3 x 10^1 КОЕ/мл

Биоматериал : моча

Антибиотикограмма	Выделенный микроорганизм 1
-	Staphylococcus intermedius
Амоксициллин	Устойчив
Амоксициллин/Клаву	Высокочувствителен
Ампицилин	Устойчив
Гентамицин	Устойчив
Доксициклин	Высокочувствителен
Имипенем	Высокочувствителен
Левомицетин	Устойчив
Левофлоксацин	Устойчив
Линкомицин	Устойчив
Меропенем	Высокочувствителен
Нитроксолин	Высокочувствителен
Оксациллин	Высокочувствителен
Офлоксацин	Устойчив
Рифампицин	Высокочувствителен
Фузидин	Высокочувствителен
Фурадонин	Высокочувствителен
Цефазолин	Высокочувствителен
Цефалексин	Высокочувствителен
Цефтазидим	Высокочувствителен
Цефотаксим	Высокочувствителен
Ципрофлоксацин	Устойчив
Цефтриаксон	Высокочувствителен
Цефуроксим	Высокочувствителен
Фурагин	Высокочувствителен
Фуразолидон	Высокочувствителен
Энрофлоксацин	Устойчив
Комбинированный пи	Устойчив
Поливалентный пио	Устойчив
Стафилококковый пи	Устойчив
Фосфомицин	Высокочувствителен
Триметоприм/сульфо	Устойчив

Staphylococcus

- Гр+ кокки, комменсалы, образуют биопле
- Коагулаза-положительные – комме , сапрофиты – коагулазо-негативные
- ***S.aureus, S.pseudointerm S. schleiferi*** могут иметь ***ген mecA***, делающий их ствительными ко всем бета-лактамам
- MRS част стентны к одному или нескольким классам: клинда цину, макролидам, ФХ, триметоприм-сульфа
- Вырабатывают пенициллиназы

Индикаторный антибиотик – ОКСАЦИЛЛИН!

Staphylococcus

Что произошло со *Staphylococcus intermedius?* Пересмотр таксономической классификации и развитие лекарственной полирезистентности

Все эти наблюдения указывают, что штаммы с традиционными фенотипическими характеристиками "*S. intermedius*" должны идентифицироваться как *S. pseudintermedius*, если они выделены от собак. Штаммы с такими свойствами, выделенные от других видов, лучше всего идентифицировать как «бактерии группы *S. intermedius*», если нет результатов оценки молекулярно-биологическими методами [33]. Хотя молекулярно-

Group	No. of strains
SIG	104
S. pseudintermedius.	89
S. delphini	11
S. intermedius	4

Результат исследования: **Обнаружен гемолитический коагулаза - положительный Staphylococcus aureus (MRSA) в количестве 2,3 х 10^6 КОЕ/мл.**
(Клинически значимая бактериурия - титр х10^5 КОЕ/мл и более, неясная бактериурия - титр х10^4 КОЕ/мл. При отборе проб мочи цистоцинтезом, любой титр является диагностически значимым. При выделении патогенных бактерий, любой титр бактерий является диагностически значимым)

Чувствительность к антибиотикам:

Антибиотики (синонимы)	1	2	3	4
Оксациллин 10 мкг	У			
Цефотаксим (клафоран, тарцефоксим) 30 мкг	У			
Гентамицин (гарамицин, генцин), 10 мкг	У			
Доксициклин (вибрамицин, доксилан, довицин)30 мкг	У			
Левомицетин (хлорамфеникол)30 мкг	У			
Линкомицин (линкоцин, нелорен)15 мкг	У			
Имипенем (тиенам, примаксин)10 мкг	Ч			
Меропенем (меронем)10 мкг	Ч			
Офлоксацин (таривид, заноцин) 10 мкг	У			
Ципрофлоксацин (ципробай, ципролет) 5 мкг	У			
Ампициллин (ампицид, амплитал, росциллин), 10 мкг	У			
Амоксициллин (кламоксил, амоксил, флемоксин), 20мкг	У			
Амоксициллин-клавунат(синулокс, амоксиклав, аугментин), 20/10 мкг	ВЧ			
Рифампицин (бенемицин, рифадин, тубоцин)5 мкг	ВЧ			
Цефуроксим (аксетин, кетоцеф) 30 мкг	У			
Цефазолин (кефзол, анцеф, цефаприм, прозолин) 30 мкг	У			
Цефалексин (оспексин, пролексин, цефаклен) 30 мкг	У			
Левофлоксацин (Таваник)5 мкг	У			
Энрофлоксацин (байтрил, энрофлон, карифлокс, энроксил, энрофлокс, энробиофлок) 5 мкг	У			
Цефтриаксон 30мкг	У			
Фосфомицин (монурал, урофосфобол) 200 мкг	ВЧ			
Интести - бактериофаг	У			
Комбинированный пиобактериофаг	У			
Поливалентный пиобактериофаг	У			
Стафилококковый бактериофаг	У			
Фузидин (10мкг)	ВЧ			
Триметоприм/сульфаметоксазол (ко-тримоксазол, бисептол) (1,25/23,75 мкг)	У			
Фурагин (300мкг)	ВЧ			
Нитроксолин (5-Нок)(20мкг)	У			
Фурадонин (300мкг)	Ч			

Enterococcus

- Гр +, факультативные анаэробы
- Мало токсинов, но отличная адгезия к тканям
- Комменсалы с большим нозокомиальным потенциалом
- Используют в составе пробиотиков ☺
- Холангиогепатиты, перитониты, эндокардиты, хир.инфекции у МДЖ

Enterococcus

- Бывают ампициллин чувствительные, ампициллин-резистентные (ARE) и ванкомицин-резистентные (VRE)
- Природная устойчивость к ЦС и аминогликозидам
- Могут быстро потерять чувствительность к карбапенемам
- ЦС-3 и ФХ могут вызывать перекрестную резистентность к ванкомицину
- Редко вырабатывают бета-лактамазы, поэтому терапия защищенными аминопенициллинами, при сохранении Ч к незащищенным неверна!
- Трим-Сульфа не эффективен in vivo.
- Ent. faecalis высевают чаще, Ent. faecium чаще резистентен к вакомицину, важно определение до вида!

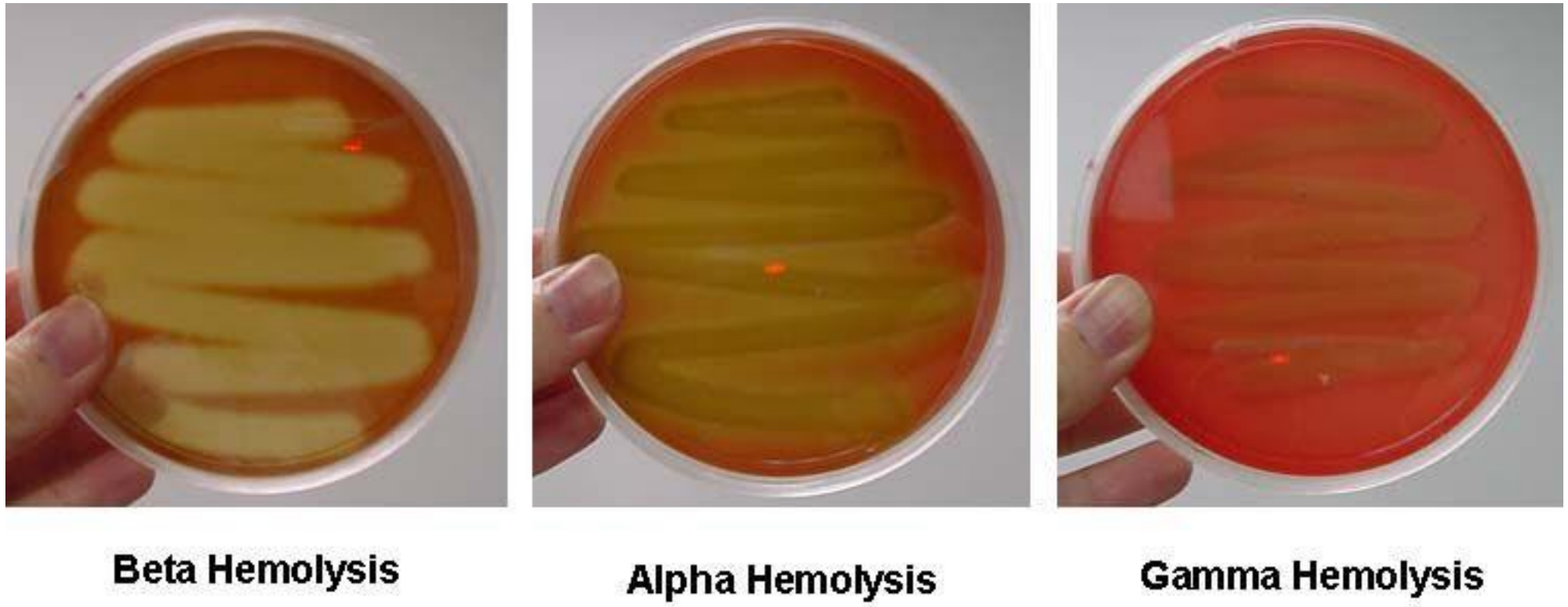
Enterococcus

- ! Для ARE важно определение МИК, т.к. в [illegible] концентрация ампициллина выше, чем в плазме и в[illegible]но достижение терапевтического эффекта
- Бессимптомная бактериур[illegible]ЗК энтерококком- наблюдение
- При сочетании с дру[illegible]озбудителями, например, при перитоните с МР[illegible]рококком – ориентироваться на другие возбудител[illegible]
- Синерг[illegible]мпициллин + гентамицин (только гента ☺)

Важен АМПИЦИЛЛИН и ванкомицин

Streptococcus

- α-гемолитические и негемолитические (St.viridans)– обычно контаминанты
- β-гемолитичесие - патогены



Streptococcus

- По типу видоспецифичного углеводного АГ клеточной стенки разделены на группы:
    - A – *St.pyogenes* инфекции у людей, тонзиллиты у МДЖ
    - B – *St.agalactiae* (метриты, перитониты, маститы и т.п.)
    - C – *St. dysgalactiae, St.equi spp.zooepidermicus* – инфекции собак: пневмония, ринит, геморрагическая пневмония
    - G – *St.canis,* оппортунист у собак и кошек (простатиты, метриты, дискоспондилиты, ИМЭМ, инфекции кожи и МВП, сепсис новорожденных, ювенильные лимфадениты кошек, синдром угасания щенков и котят)
    - Некротизирующий фасцит и миозит собак, St.canis («плотоядная бактерия»), вызывает синдром токсического шока.

Streptococcus

- Группа G – чувствительны к пенициллинам, резистентность крайне редка.
- НЕ вырабатывают бета-лактамазы!!!
- НЕ чувствительны в аминогликозидам, исключение – синергизм с бета-лактамами

Результат исследования:

1. Обнаружен гемолитический Proteus mirabillis в количестве 9,8 х 10^6 КОЕ/мл.
2. Обнаружен бетта гемолитический Streptococcus pyogenes в количестве 1,4 х 10^5 КОЕ/мл.
(Клинически значимая бактериурия - титр х10^5 КОЕ/мл и более, неясная бактериурия - титр х10^4 КОЕ/мл. При отборе проб мочи цистоцинтезом, любой титр является диагностически значимым. При выделении патогенных бактерий, любой титр бактерий является диагностически значимым)

Чувствительность к антибиотикам:

Антибиотики (синонимы)	2	3	4
Оксациллин 10 мкг	У		
Цефотакс			
Гентамиц			
Доксицик			
Левомице			
Линкомиц			
Имипенем			
Меропене			
Офлоксац			
Цефтазид			
Ципрофл			
Ампицилл			
Амоксици			
Амоксици			
Рифампи			
Цефурокс			
Цефазол			
Цефалекс			
Левофлок			
Энрофлок			
Цефтриак			
Фосфоми			
Интести -			
Комбинир			
Поливале			
Стрептоко			
Фузидин (			
Триметоп			
Фурагин (300мкг)	МЧ		
Нитроксолин (5-Нок)(20мкг)	У		
Фурадонин (300мкг)	МЧ		
Фуразолидон (300мкг)	У		

Условные обозначения: ВЧ – высокочувствителен; Ч – чувствителен; МЧ – малочувствителен; Х – хс [illegible] не тестировалось

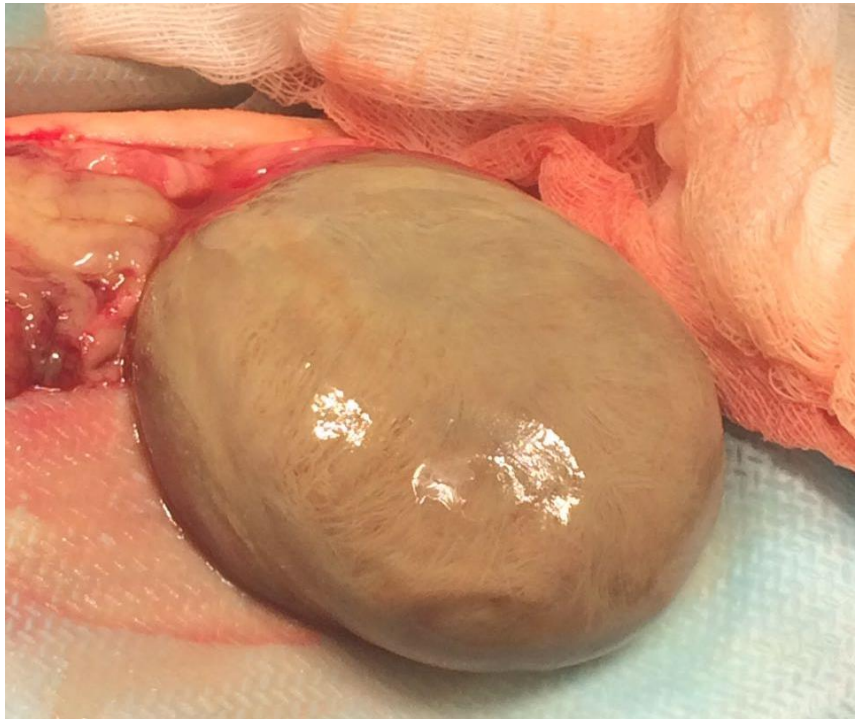
Corynebacteria urealiticum

- Гр+ палочка, облигатный аэроб, нормальная флора МВП кошек(?)
- Активный уреазопродуцент
- Вызывает оппортунистические инфекции после катетеризации МП
- Быстро приобретает резистентность

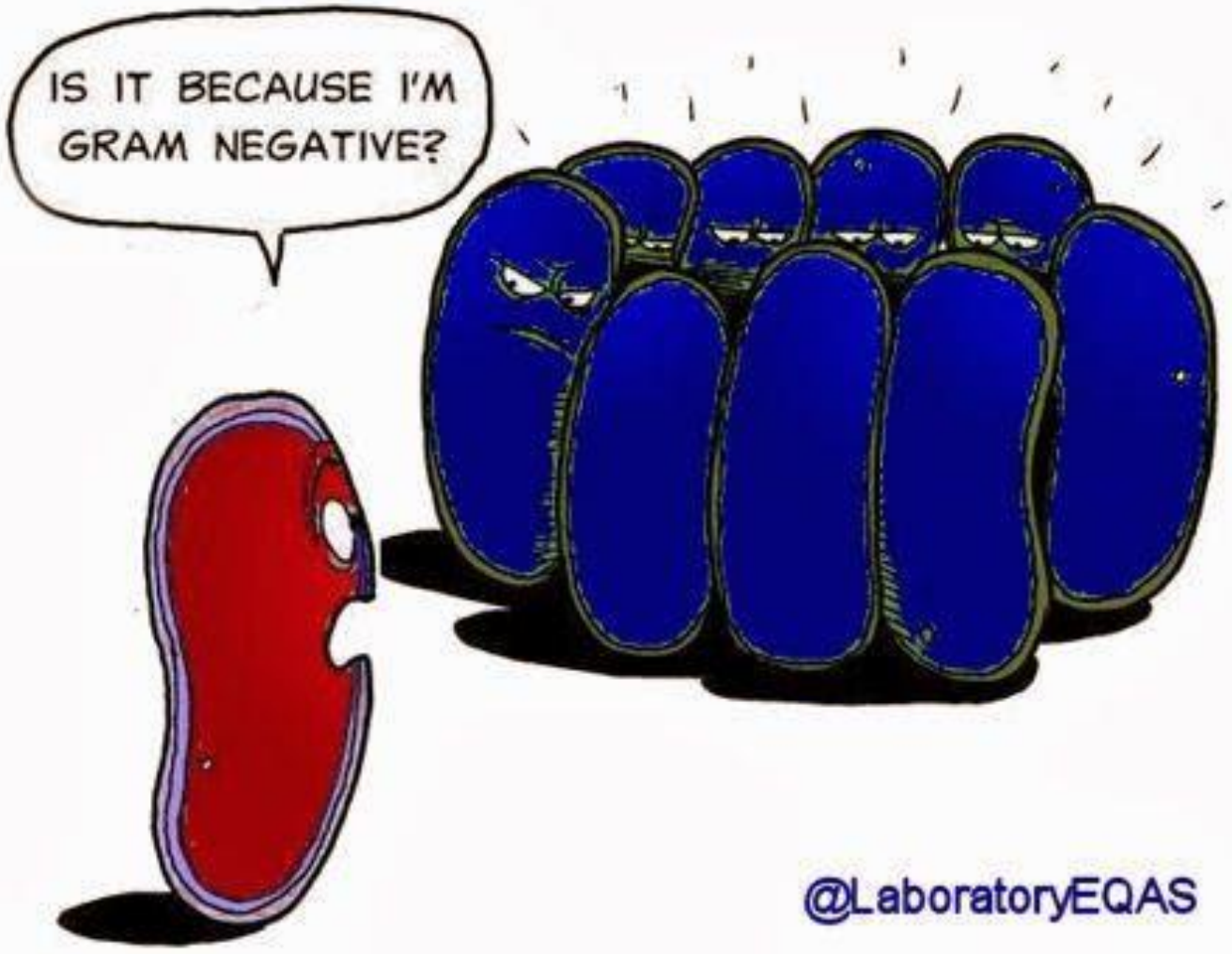
Посев на флору и АЧ

1 Corynebacterium urealyticum 10^6 КОЕ/мл

Чувствительность к препаратам	1
PENICILLIN	R
GENTAMICIN	R
CIPROFLOXACIN	R
MOXIFLOXACIN	R
TETRACYCLINE	R
CLINDAMYCIN	R
RIFAMPICIN	R



Gram Staining Case



Pseudomonas aeruginosa

- Гр-, неферментирующая, облигатный аэроб
- Может быть в норме в ЖКТ, носу, ротовой полости, ВДП и конъюнктиве
- ***Природная устойчивость к ампициллину, амоксициллину, ко-амоклициллину, 1-2 поколению ЦС, цефотаксиму и цефтриаксону***
- Быстро развивает устойчивость к любым АБ, кроме, возможно, колистина и меропенема
- Много резистентных к ФХ штаммов.
- Механизмы резистентности: бета-лактамазы, потеря пориновых белков, активные помпы

Кот, 5 лет

Холецистит, холангиогепатит

Проведен забор желчи, посев, биопсия печени (норма по цитологии)

По результату назначен Амоксиклав.

Посев

Коментарий :
При культуральном исследовании выделены:

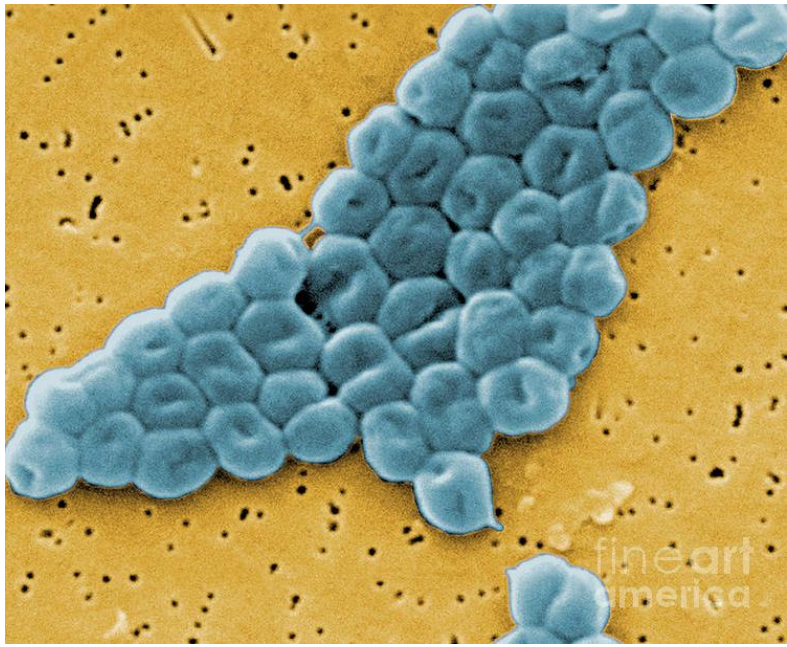
Нефер.бактерии Pseudomonas spp. Менее 10^3 КОЕ/мл - не

Биоматериал : Желчь

Антибиотикограмма	Выделенный микроорганизм 1
-	Pseudomonas spp
Амикацин	Чувствителен
Амоксициллин/Клав	Чувствителен
Ампицилин	Устойчив
Гентамицин	Чувствителен
Доксициклин	Устойчив
Ко-тримоксазол	Устойчив
Левомицетин	Устойчив
Цефалексин	Устойчив
Цефтазидим	Чувствителен
Цефотаксим	Слабочувствителен
Ципрофлоксацин	Чувствителен
Энрофлоксацин	Чувствителен

Acinetobacter baumannii

- Гр-, неферментирующая, полиморфная
- Любит влажную среду, часто у интубированных пациентов
- Нозокомиальный потенциал – легко колонизирует катетеры, трубки и дренажи, персистирует во внешней среде
- Колонизация ≠ инфекция
- Инфекция в «водной» среде – пневмонии, ИМВП, перитониты
- Резистентна к аминопенициллинам и ЦС-1, быстро набирает резистентность



Enterobacteriaceae

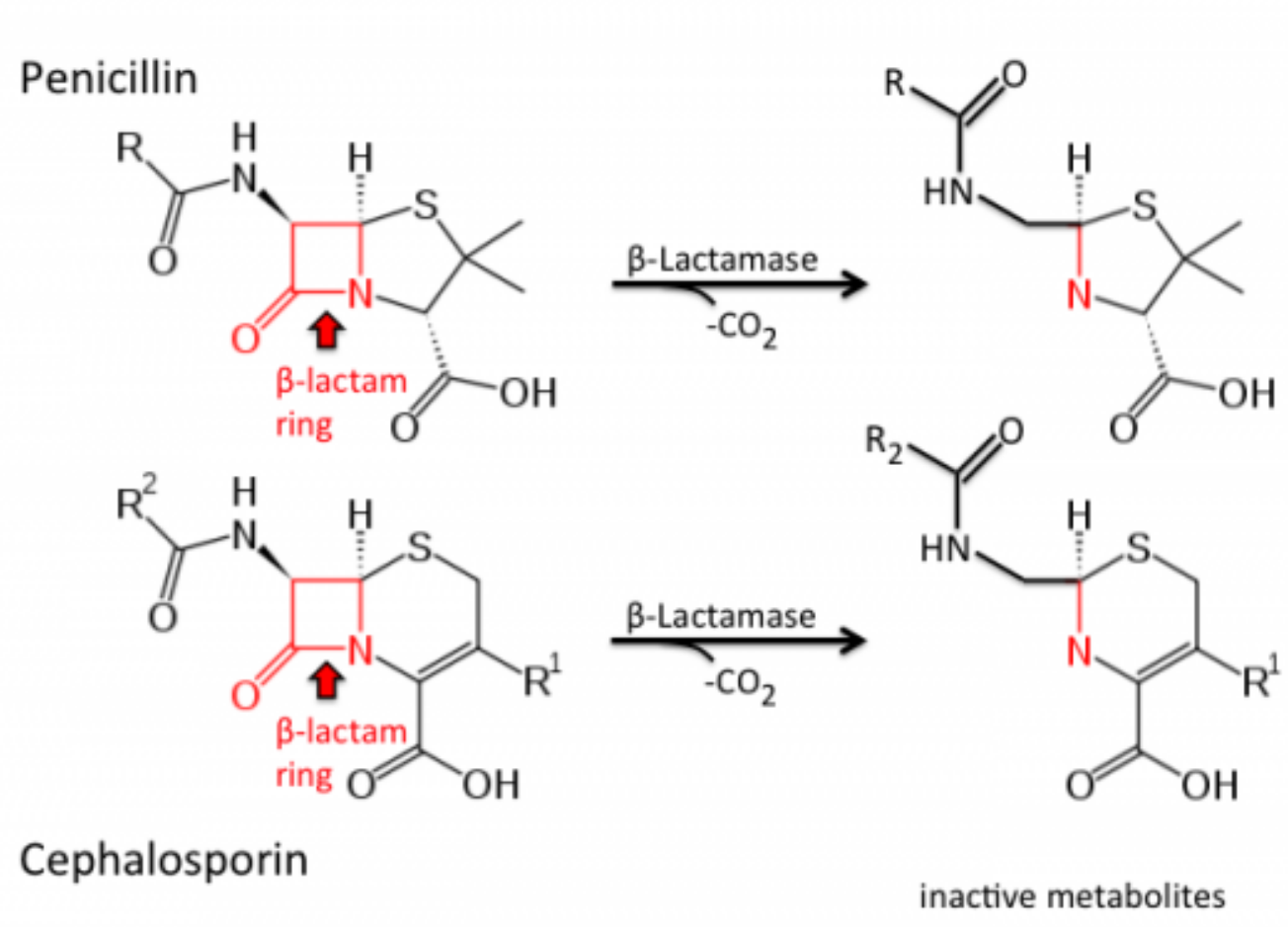
Enterobacteriaceae

- Большое семейство Гр- бактерий
- Иммунный ответ на липополисахарид и эндотоксины
- Жгутики для движения и пили для адгезии

- «Патогенные комменсалы»
- Могут вызывать инфекцию в любой точке организма

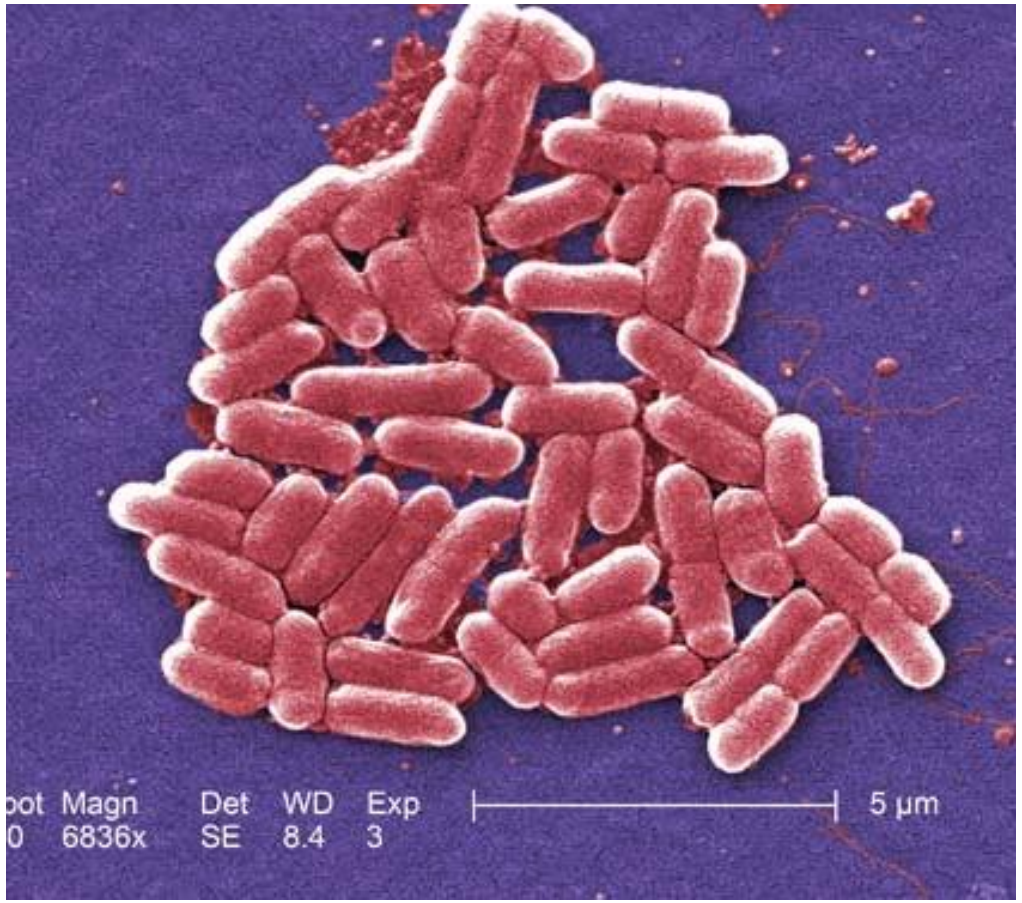
Бета-лактамазы расширенного спектра

- Расщепление бета-лактамного кольца инактивирует антибиотик
- Устойчивость к ферментам разная
- БЛРС – наиболее широкая активность против аминопенициллинов, ЦС – 1, 2, 3
- Защита ингибитором?



Escherichia coli

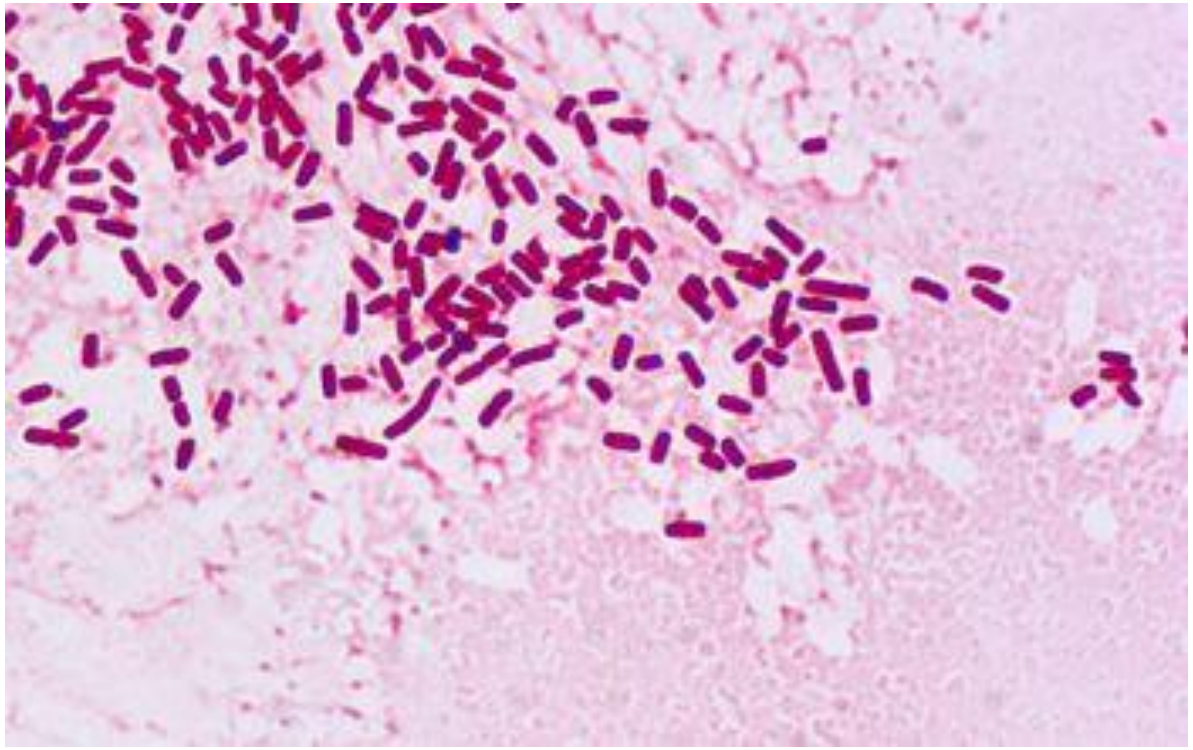
- Способность расщеплять лактозу не говорит о патогенности
- Есть патогенные штаммы, определение генетически
- Часто множественная резистентность к аминопенициллинам, ФХ и ЦС
- БЛРС-продуцент



Enterobacter

- E. aerogenes и E.cloacae высевают чаще всего
- Множественная резистентность
- Природная резистентность к амоксициллину, амоксиклаву, ЦС-1

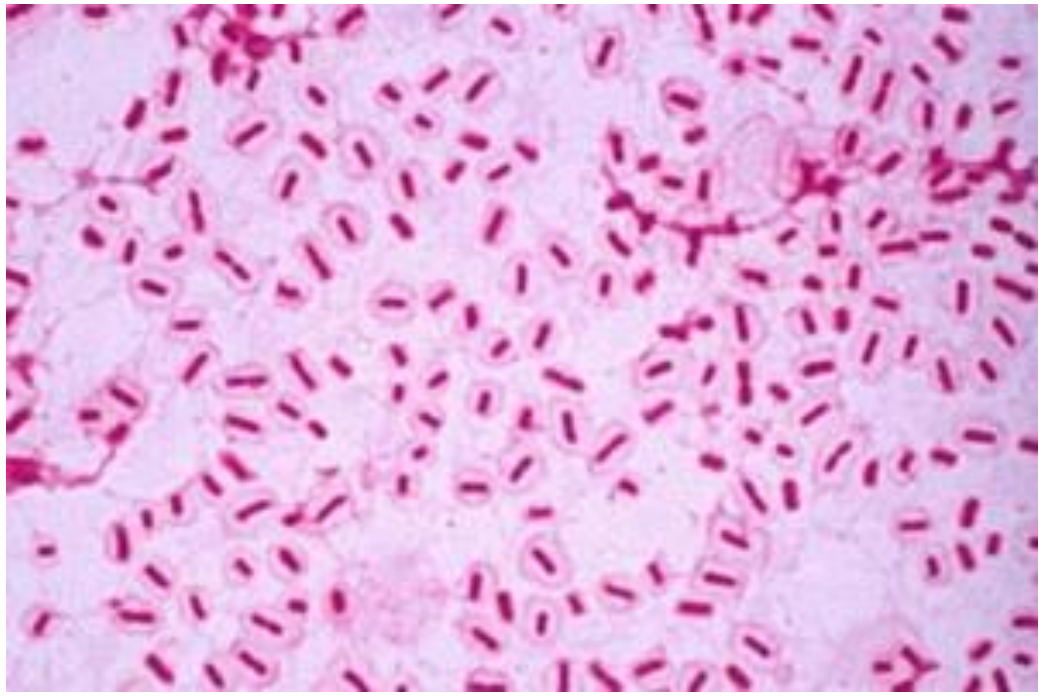
- БЛРС-продуцент



Klebsiella pneumoniae

- Нормальная флора ЖКТ
- Имеет антифагоцитарную капсулу
- Не чувствительная к амоксилциллину

- Вырабатывает БЛРС и карбапенемазы



Proteus

- P.mirabilis и P.vulgaris
- Хорошо крепятся к уроэпителию
- Вырабатывают уреазу
- Не чувствительны к нитрофурантоину, макролидам, тетрациклину, P.mirabilis чаще Ч к аминопенициллинам и ЦС-1.

- В остальном как все энтеробактерии – БЛРС и МБЛ возможны, широко распространена устойчивость к ФХ

Enterobacteriaceae

- Природная устойчивость к ампициллину и амоксициллину, гликопептидам ☺
- Широкое распространение БЛРС
- ! Резистентность к ЦС 2-3 – высокая вероятность БЛРС
- Резистентность к защищенным пенициллинам – незащищенные точно не подействуют☺
- Широкое распространение карбапенемаз, весь класс лактамов не работает
- Частая совмещенная резистентность к ФХ, аминогликозидам
- Появились штаммы, резистентные к колистину

Спасибо за внимание