

## ПУТИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОГРЕССА В МИКРОБИОЛОГИИ

*Н.С. Багирова. Диагностика бактериемии: что нового?*  
Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Диагностика бактериемии является одной из наиболее важных функций лаборатории клинической микробиологии. По данным CDC (Центр по контролю над заболеваемостью США), случаи внутрибольничного сепсиса увеличились с 621 000 в 2000 г. до 1 141 000 в 2008 г. [1]. Летальность от сепсиса составляет 28–50% [2]. Микробиологическая диагностика сепсиса основана на исследовании крови, т. е. на установлении бактериемии. Бактериemia – присутствие микроорганизмов в системном кровотоке – является важнейшей предпосылкой для развития сепсиса, и диагностика бактериемии – это реальная возможность получить данные о возбудителе сепсиса, о его чувствительности к антимикробным препаратам. Своевременная диагностика бактериемии способствует ранним и адекватным лечебным действиям, которые могут предотвратить развитие сепсиса и его последующих этапов, связанных с высокой летальностью.

В течение последних 40 лет накоплен огромный опыт работы в этой области, разработаны новые методы и технологии, позволяющие не только совершенствовать этот метод, но и сократить время исследования. Создание и внедрение в практику автоматических систем непрерывного контроля инкубации гемокультур (Versa TREK, Bact/Alert, BACTEC FX), несомненно, является большим достижением в области диагностики бактериемии. Для каждого из подобных геманализаторов разработаны соответствующие флаконы с питательными средами для оптимального роста возбудителей. Состав и качество питательных сред имеет большое значение для оптимизации диагностики бактериемии. Комплект флаконов должен быть подобран таким образом, чтобы создать возможность для роста от самых неприхотливых микроорганизмов до наиболее привередливых. Следует учитывать и вероятность влияния антимикробной терапии на результат посева крови, поэтому включение в комплект флаконов со специальными добавками для нивелирования влияния антибиотиков весьма целесообразно. Сравнительные исследования возможностей тех или иных геманализаторов со специальным набором флаконов демонстрируют, безусловно, более высокую эффективность автоматических систем непрерывного контроля инкубации гемокультур по сравнению с прочими геманализаторами и ручным методом диагностики бактериемии.

Для диагностики бактериемии, обусловленной внутрисудистыми устройствами, в настоящее время рекомендован метод парных посевов крови с дифференцированным временем роста (ДРВ): посев образцов крови, взятых одновременно из катетера и периферической вены (IDSA – Infectious Diseases Society of America; Общество инфекционных заболеваний США). Следует заметить, что данный метод возможен только при наличии в лаборатории современного анализатора гемокультур с функцией фиксации времени роста микроорганизмов в инкубируемых флаконах (автоматизированная система длительного мониторинга с непрерывным контролем). Разница во времени роста между образцом крови, взятым для посева из катетера и вены, должна составлять для взрослых пациентов  $\geq 120$  мин, для детей  $\geq 150$  мин с приоритетным ростом образца крови из катетера. Следует подчеркнуть, что при данном методе диагностики нет необходимости удалять катетер.

Надежность методов идентификации микроорганизмов, особенно в условиях нередкого в последние годы появления совершенно новых возбудителей бактериемии и сепсиса, в современных условиях как нельзя лучше обеспечена при использовании масс-спектрометра MALDI-TOF Microflex LT (Biotyper)(Bruker, Daltonics). Биоинформационное про-

граммное обеспечение данного прибора позволяет надежно и точно проводить видовую идентификацию любых микроорганизмов путем сопоставления получаемых масс-спектров микроорганизмов с обширной базой данных. Преимуществами такого подхода являются несложная пробоподготовка, высокая чувствительность, быстрота анализа и низкая стоимость используемых реактивов и материалов. Время от момента получения лабораторией биоматериала для исследования до выдачи окончательного ответа при традиционном подходе к диагностике бактериемии занимает в лучшем случае от 3 до 5 дней. При использовании специального набора для работы с положительными культурами MALDI Septityper Kit 50 и/или пробирки с гелем Vacutainer (BD, REF 367954) можно существенно сократить время исследования, а в некоторых случаях выдать ответ даже в день посева крови. Набор Septityper Kit 50 позволяет провести в течение 15–20 мин пробоподготовку содержимого флакона, в котором получен рост микроорганизма после инокуляции крови, с последующей идентификацией возбудителя на MALDI-TOF. Для пробоподготовки можно использовать более простой и быстрый метод. В пробирку с гелем Vacutainer добавить 3 мл содержимого флакона с положительной гемокультурой, центрифугировать 15 мин при 3000 оборотов в минуту. Далее следует собрать необходимое количество осадка на поверхности геля и использовать одновременно для идентификации (MALDI-TOF) и определения чувствительности к антимикробным препаратам (Microscan WalkAway 96+). Такой подход к работе с гемокультурами значительно сокращает время, необходимое для выдачи окончательного результата исследования.

Традиционные методы идентификации возбудителей не соответствуют современным требованиям, предъявляемым к скорости, стандартизации и автоматизации процесса. Своевременная и корректная диагностика бактериемии существенно влияет на снижение случаев необоснованного и неадекватного назначения антимикробных препаратов, что не может не сказаться на результатах терапии инфекционных осложнений у больных. На современном этапе полноценное решение поставленных перед клиническими микробиологами задач по диагностике инфекционных осложнений возможно только с применением новых методов.

*С.А. Глазунова. Флюоресцентные методы анализа для микробиологических исследований.* «Термо Фишер Сайентифик», Москва

В настоящее время люминесцентные методы исследований находят все более широкое применение в различных областях научной и практической работы: в вирусологии, гистологии (нормальной и патологической), физиологии, ботанике, онкологии, радиобиологии, а также при проведении лабораторно-клинических анализов, в санитарных и судебно-медицинских исследованиях. Большой интерес представляет предложенный Кунсом и его сотрудниками исключительно чувствительный люминесцентно-иммунохимический метод меченых антител.

Преимущества флюоресцирующих красителей перед обычными цитологическими или гистологическими реактивами заключается прежде всего в возможности применять флуорохромы в самых минимальных количествах и в очень слабых концентрациях (1:100 000–1:5 000 000). Благодаря этому химическое, повреждающее воздействие на клетки сводится до минимума, объект изучается в наиболее физиологических условиях. Относительная безвредность флуорохромирования позволяет широко использовать метод прижизненной окраски, имеющий большие преимущества.

Наиболее распространенными методами люминесцентного анализа в микробиологии на сегодняшний день являются люминесцентная микроскопия и проточная цитометрия. Преимуществами метода флюоресцентной микроскопии

является быстрота оценки жизненного состояния прокариотических клеток без какого-либо их повреждения. Они экономичны по времени и точны, за короткое время можно исследовать большое количество проб на небольшом по объему материале.

В последние годы проточная цитометрия становится одним из наиболее востребованных методов как для фундаментальных исследований, так и для диагностики. Метод проточной цитометрии обладает существенными преимуществами по сравнению с рутинными методами, традиционно применяемыми в клинических лабораторных исследованиях. Проточная цитометрия в микробиологических исследованиях применяется для обнаружения и идентификации микроорганизмов в исследуемом образце, что является индикатором метаболической активности, для подсчета количества бактериальных клеток в образце, для оценки жизнеспособности бактерий и многих других задач.

Настоящим технологическим прорывом в проточной цитометрии является появление такого метода, как проточная цитометрия с акустическим фокусированием. Он заключается в том, что наравне с гидродинамическими силами применяются ультразвуковые волны (более 2 МГц, аналогичные тем, которые используются при медицинской визуализации), чтобы выстроить клетки в одну сфокусированную линию вдоль центральной оси капилляра. Применение данной технологии позволяет значительно повысить точность получаемых результатов и снизить времязатраты, что является особенно важным преимуществом для большого числа микробиологических исследований.

Таким образом, применение люминесцентных методов нового поколения в микробиологических исследованиях позволяет быстро получать более точные данные в сравнении с рядом традиционных методик.

*Л.А. Корноухова. Результативность применения масс-спектрометрии при автоматизации микробиологической диагностики.* Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, ЗАО «Северо-Западный центр доказательной медицины», Санкт-Петербург

Внедрение MALDI-TOF масс-спектрометрии в микробиологическую диагностику произвело качественные изменения, значительно расширив возможности по видовой идентификации трудно культивируемых микроорганизмов, сократив сроки исследования, сфокусировав внимание врача на актуальных проблемах устойчивости к антибактериальным препаратам. Данная методика идентификации экономически наиболее выгодна по сравнению с другими бактериологическими анализаторами. Ограничением по внедрению в рутинную практику подобных приборов является высокая стоимость оборудования.

Цель – оценить результативность использования масс-спектрометрической идентификации микроорганизмов в деятельности микробиологической лаборатории.

При оценке результатов работы на MALDI-TOF анализаторе (Microflex/Bruker Daltonics, Германия) использованы данные бактериологических исследований за период 2009–2012 гг., включающие видовую идентификацию микроорганизмов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии при культивировании на широком перечне сред (Oxoid, Biogad), в том числе с использованием анаэробных технологий. Применены показатели: количество идентифицированных микроорганизмов, эквивалент полной занятости (ЭПЗ), соответствующий 2080 ч рабочего времени в год, технического, непосредственно выполняющего работы, персонала лаборатории (ЭПЗт).

При внедрении в 2009 г. MALDI-TOF масс-спектрометрии для подготовки образцов использовали методику экстракции муравьиной кислотой. В 2008 г. идентификаций выполнили 550 ед/ЭПЗт, в 2009 г. – 2180 ед/ЭПЗт, т.е. количество идентификаций на 1 ЭПЗт увеличили в 3 раза, при этом рост эквивалента полной занятости технического персонала незначи-

тельный – 4%: с 10,79 ед. в 2008 г. до 11,21 ед. в 2009 г. соответственно. В 2010 г. внедрена методика прямого нанесения образцов, это значительно повысило результативность работы: при сокращении на 17% ЭПЗт количество идентификаций возросло до 8340 ед/ЭПЗт, т.е. увеличилось в 2,9 раза. В дальнейшем периоде в методику подготовки проб изменений не вносили. В 2012 г. зафиксировано максимальное количество идентификаций 18700 ед/ЭПЗт при 10,95 ед. эквивалента полной занятости технического персонала, в этот период прибор эксплуатировался крайне интенсивно: в среднем в течение 11 ч в день, при этом возросло количество поломок оборудования и назрела необходимость приобретения дублирующего оборудования.

Масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов позволяет значительно увеличить производительность микробиологической лаборатории. Наш опыт продемонстрировал при 2% увеличении эквивалента полной занятости технического персонала 33-кратное увеличение количества идентификаций (550 ед/ЭПЗт в 2008 г., 18700 ед/ЭПЗт в 2012 г.). Необходимо обратить внимание, что высокая интенсивность при эксплуатации анализаторов приводит к зависимости от бесперебойной работы оборудования и соответственно к потребности расширения парка этих приборов. Можно рекомендовать приобретение MALDI-TOF-систем для выполнения рутинных исследований централизованным бактериологическим лабораториям, а также лабораториям крупных стационаров с высоким риском внутрибольничных инфекций, имеющих отделения ОРИТ, хирургические, ожоговые, онкологические.

*Т.Г. Михайлова, Е.В. Алиева, Ю.В. Первушин. Ускоренные методы диагностики туберкулеза. Сообщение 1. Культуральные методы.* ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России; ГБУЗ СК «Ставропольский краевой клинический противотуберкулезный диспансер»

В докладе секретариата ВОЗ «Глобальная стратегия и цели в области профилактики, лечения и борьбы с туберкулезом на период после 2015 г. отмечен устойчивый прогресс в прекращении распространения и сокращении заболеваемости туберкулезом в мире. В Ставропольском крае на фоне снижения заболеваемости туберкулезом постоянного населения с 42,8 до 40,7 на 100 тыс. населения и снижения распространенности туберкулеза с 150,3 в 2012 г. до 145,3 в 2013 г. растет смертность от туберкулеза – в 2012 г. 6,6 на 1000 тыс. населения, а в 2013 г. 7,4. Продолжает увеличиваться удельный вес множественной лекарственной устойчивости штаммов к противотуберкулезным препаратам (ППП) среди впервые выявленных больных: 10,1% в 2012 г. и 13,8% в 2013 г., а также среди контингентов диспансерного учета: 24,6% 2012 г. и 29,8% – 2013 г. По данным бактериологической лаборатории ГБУЗ Ставропольского края «Краевой клинический противотуберкулезный диспансер» в 2013 г. отмечается общее увеличение количества устойчивых штаммов как у впервые выявленных больных, так и у больных, леченных противотуберкулезными препаратами, относительно предыдущих лет. Если от впервые выявленных больных в 2011 г. было выделено 53% чувствительных штаммов, в 2012 г. – 45,5%, то в 2013 г. 49,5% от выделенных штаммов были с чувствительностью к ППП. Также и среди контингента больных: 2011 г. – 76,5% штаммов с устойчивостью, 2012 г. – 75,4%, 2013 г. – 79%. Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) выше, чем в 2012 г. в целом, на 8,1% за счет увеличения процента устойчивости к изониазид + рифампицин + стрептомицин (больше, чем в 2012 г. на 6%), и изониазид + рифампицин + стрептомицин + этамбутол (больше, чем в 2012 г. на 4,8%). У больных, получавших лечение ППП, увеличивается и устойчивость к рифампицину + другой ППП (стрептомицин, этамбутол, пирразинамид): 2011 г. – 0,6%, 2012 г. – 0,3%, 2013 г. – 1,2%. Снижается устойчивость к стрептомицину + этамбутолу: 2011 г. – 1,5%, 2012 г. – 1,9%, 2013 г. – 0,2%. В сложившихся условиях становится особенно актуальной ускоренная диагностика

туберкулеза и выявление устойчивости микобактерий к противотуберкулезным препаратам. Время появления первой генерации микобактерий составляет в среднем 19–81 день. Для ускорения процесса выделения чистой культуры возбудителя туберкулеза и определения его лекарственной устойчивости в настоящее время используются автоматизированные системы, которые позволяют быстро, надежно и безопасно выявить возбудитель туберкулеза в клинических образцах. Культивирование микроорганизмов осуществляется в специальных пробирках с жидкой питательной средой. Для стимуляции роста микобактерий и подавления роста посторонней микрофлоры используются ростовые добавки и антибиотики для подавления роста сопутствующей микрофлоры. Регистрация роста микроорганизмов осуществляется оптически. Лекарственная чувствительность микобактерий туберкулеза определяется на основе модифицированного метода пропорций. В процессе определения происходит сравнение скорости роста микобактерий туберкулеза в контрольной пробирке и в пробирках с лекарственными препаратами. Одновременное использование двух питательных сред предоставило возможность проанализировать важный микробиологический показатель, а именно скорость роста возбудителя туберкулеза в автоматизированной системе и классическим методом, а также скорость определения лекарственной чувствительности обоими методами исследования. С этой целью был проведен сравнительный анализ скорости роста микобактерий туберкулеза в 1028 посевах, в которых рост микобактерий туберкулеза был получен из одного диагностического материала параллельно на двух питательных средах. Скорость выявления возбудителя туберкулеза на жидкой питательной среде колебалась в пределах 4–24 сут, составляя в среднем 12 сут. В то же время продолжительность культивирования того же самого материала на плотной среде Левенштейна–Йенсена с момента посева до появления видимого роста колебалась в пределах 19–81 дня (в среднем 43), т. е. в 3,5 раза дольше. Определение лекарственной чувствительности микобактерий к препаратам 1-го ряда в автоматическом анализаторе требовало от 5 до 12 дней культивирования, что позволяло получить окончательный результат уже в течение первого месяца с момента начала исследования. При использовании плотных сред для получения аналогичных результатов необходимо в 3–4 раза больше времени. Продолжительность отрицательного анализа при использовании автоматического метода составляет 42 дня, тогда как на плотной питательной среде – 84 дня, т. е. в 2 раза дольше.

Полученные данные с наглядностью демонстрируют преимущества автоматизированной системы при выявлении возбудителя туберкулеза и верификации туберкулезной этиологии процесса перед классическими методиками.

*Т.Г. Михайлова, Е.В. Алиева, Ю.В. Первушин. Ускоренные методы диагностики туберкулеза. Сообщение 2. Молекулярно-биологические методы.* ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России; ГБУЗ СК «Ставропольский краевой клинический противотуберкулезный диспансер»

Другие методы идентификации бактерий туберкулезного комплекса основаны на выявлении специфических последовательностей ДНК микобактерий. Методы ДНК-диагностики (ПЦР, микрочипы) занимают несколько часов и обеспечивают высокую чувствительность и специфичность анализа. В 2012 г. в бактериологической лаборатории ГБУЗ СК «Ставропольский краевой клинический противотуберкулезный диспансер» введен молекулярно-генетический метод (ПЦР Real-time) выявления мутаций устойчивости к основным противотуберкулезным препаратам – изониазиду и рифампицину.

Достоинства ПЦР исследования: прямое определение возбудителей; быстрота проведения анализа; возможность исследования любого диагностического материала; высокая специфичность; высокая чувствительность.

За 2013 г. было выполнено 1801 (на 75% больше, чем в 2012 г.) ПЦР исследований диагностического материала на выявление и количественное определение микобактерий туберкулеза

(МБТ), из них 1504, или 83,5%, составляет категория впервые выявленных больных. Из 1283 ПЦР-отрицательных проб в 19 пробах получена культура МБТ на плотных средах и в 12 пробах – на жидких средах. Следовательно, чувствительность ПЦР, по нашим данным, не является 100%, а составляет 97,6%.

В 2013 г. в 153 пробах диагностического материала определялись мутации антибиотикоустойчивости к изониазиду и рифампицину методом ПЦР (всего 1224 исследования). В 83 (54,2%) пробах обнаружены мутации устойчивости к изониазиду; в 15 (9,8%) пробах – мутации устойчивости к рифампицину. Среди выявленных мутаций устойчивости к изониазиду – в 92,2% мутация обнаружена в гене *kat G*, 315 кодоне с заменой Ser-Thr и 7,8% в гене *inhA C209 T*. Причем в 15% случаях, мутация в гене *kat G*, 315 кодоне с заменой Ser-Thr сочеталась с мутацией в гене *inhA C209 T*.

Среди выявленных мутаций устойчивости к рифампицину в 70% случаев мутация обнаружена в гене *groB 531* кодоне с заменой Ser-Leu. В 13% мутация обнаружена в гене *groB 526* кодоне со всеми возможными заменами His-Tyr, His-Asp, His-Arg, His-Asn, в 516 кодоне с заменой Asp-Tyr и в 533 кодоне с заменой Leu-Pro – по 8%.

Все образцы, устойчивые к рифампицину, были устойчивы к изониазиду, т. е. имели мутации в генах *kat G* и/или *inhA C209 T*, и классифицировались как микобактерии со множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ).

Кроме метода ПЦР, в 2013 г. в бактериологической лаборатории введен новый метод молекулярно-генетической диагностики туберкулеза – катриджная система. Преимущества данного метода: выделение и амплификация производится в картридже, предобработка диагностического материала сводится к минимальным манипуляциям; возможность контаминации резко сокращается; резко сокращается возможность операторской ошибки; не требуется зонирования помещений; возможность одновременного выявления ДНК МБТ и мутаций устойчивости к рифампицину.

За 7 мес 2013 г. на катриджной системе молекулярно-генетической диагностики туберкулеза было выполнено 149 исследований, в 110 пробах выявлена ДНК МБТ. Из 110 положительных проб в 51 обнаружены мутации устойчивости к рифампицину. Из этих 51 ПЦР-положительных, рифампициноустойчивых проб в 22 определялась устойчивость к основным противотуберкулезным препаратам культуральным методом. 18 проб были устойчивы к рифампицину и 4 пробы сохраняли фенотипическую чувствительность к рифампицину. В 59 ПЦР-положительных пробах не выявлено мутаций устойчивости к рифампицину. Из них в 15 пробах также определялась устойчивость к основным противотуберкулезным препаратам культуральным методом и все 15 проб были чувствительны к рифампицину.

Надежной и экономичной альтернативой культуральным, биохимическим и молекулярно-генетическим методам являются иммунохроматографические тесты. Они основаны на иммунохимическом выявлении секреторного антигена МРТ64, экспрессируемого только клетками комплекса *M. tuberculosis*, что обеспечивает необходимую специфичность анализа. Исследование занимает 15 мин, для его проведения не требуется специальное оборудование. Для анализа могут использоваться культуры микобактерий, выращенные как на плотных, так и на жидких питательных средах, в том числе контаминированные неспецифической микрофлорой. Чувствительность теста составляет 98,5–100%, специфичность 100%.

Таким образом, введение ускоренных методов диагностики туберкулеза и определения его лекарственной устойчивости позволило значительно сократить сроки подтверждения диагноза туберкулеза и контролировать эффективность химиотерапии у больных туберкулезом.

*Е.Л. Баранцевич, Н.Е. Баранцевич, В.Л. Эмануэль, Е.В. Шляхто. Идентификация нозокомальных штаммов бактерий по последовательности нуклеотидов гена 16S РНК в рутинной практике.* ФМИЦ им. В.А. Алмазова, СПбГМУ им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

Оценка последовательности нуклеотидов гена 16S РНК (полный размер гена 1540 пар нуклеотидов) представляет собой высокоэффективный метод идентификации большинства бактерий. Целью настоящей работы было оценить эффективность применения секвенирования первых 500 пар нуклеотидов данного гена для идентификации нозокомиальных штаммов бактерий в рутинной лабораторной практике.

Штаммы бактерий, выделенные из клинического материала пациентов многопрофильного стационара, идентифицировали с применением стандартных фенотипических методов, применяемых в большинстве микробиологических лабораторий, а также с использованием секвенирования первых 500 пар нуклеотидов гена 16S РНК. Для идентификации штаммов использовали валидированную библиотеку MicroSeq ID 16S rDNA500 Library v2.0.

Исследовали 235 нозокомиальных штаммов бактерий. Исследуемые штаммы были выделены из крови (58), клапанов сердца (6), бронхоальвеолярного лаважа (24), мокроты (25), плеврального экссудата (5), ткани легкого (4), мочи (45), операционных ран (33), урофарингеальной области (23), браш-биопсии эндометрия (9), фекалий (3).

При использовании фенотипических методов диагностики, используемых в большинстве отечественных лабораторий, исследуемые изоляты были отнесены к 19 видам и 15 родам бактерий. При использовании секвенирования первых 500 нуклеотидов гена 16S РНК среди изучаемых изолятов были выявлены 57 различных видов, относящихся к 27 родам. Применение фенотипических методов позволило безошибочно идентифицировать *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecium*, *P. acne*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *A. Baumannii* во всех случаях. Ошибочные результаты были зафиксированы при идентификации *E. faecalis* в 2,8%, *E. coli* в 5,9%, *S. epidermidis* в 18,1%, *P. mirabilis* и *S. maltophilia* в 20%, *B. thuringiensis* в 25%, *K. pneumoniae* в 28,5% случаев.

Использование молекулярно-генетических методов с применением базы данных MicroSeq ID 16S rDNA500 Library v2.0 позволило получить валидированные результаты видовой идентификации для 97,9% изолятов. Не удалось идентифицировать до вида/полвида 3 (7,8%) штамма стрептококков, 1 штамм из рода *Paenibacillus*. Один изолят идентифицирован не был.

**Выводы.** 1. Анализ последовательности первых 500 пар нуклеотидов гена 16S РНК с использованием валидированной библиотеки MicroSeq ID 16S rDNA 500 Library v2.0 показал высокую эффективность в идентификации большинства изученных нозокомиальных штаммов.

2. Молекулярно-генетическая методика показала высокую эффективность при использовании в этиологической диагностике инфекций сосудистого русла, госпитальной пневмонии, инфекционного эндокардита и других тяжелых инфекций, при которых правильная видовая идентификация возбудителя является жизненно необходимой.

Адекватные данные при проведении эпидемиологического анализа госпитальных инфекций не могут быть получены с использованием обычных фенотипических методов идентификации возбудителей, используемых в большинстве отечественных стационаров.

*А.Р. Мавзютов, Л.А. Нуретдинова, В.В. Романова. Сопоставление результатов молекулярно-генетического и цитологического исследований при бактериальном вагинозе.* ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, Уфа; ООО УЗ ЛДЦ «Наджа», Сургут, ХМАО-Югра

Проблема бактериального вагиноза (БВ) остается актуальной. При этом в ходе лабораторного обследования нередко происходит смысловое смешение, особенно при использовании новых методов (ПЦР в режиме «реального времени», жидкостное цитологическое (ЖЦ) исследование), целевых установок этих исследований: характеристика микробиоты влагалища методом ПЦР и оценка интенсивности воспалительных и пролиферативных процессов методом ЖЦ. В связи с этим целью данной работы явилось сравнение данных получаемых указанными методами.

Исследованы отделяемое слизистых влагалища и соскобы цервикального канала 57 женщин в возрасте 16–48 лет при использовании real-time ПЦР «Фемофлор» («ДНК-технология», Россия) и метода жидкостной цитологии.

В результате проведенного исследования соскоба из цервикального канала методом ЖЦ патологические изменения различного характера были установлены у 36 (63%) обследованных. Из них при использовании цитологических критериев в 9 (25%) случаях констатирован «бактериальный вагиноз без воспалительных изменений» и в 27 (75%) – «воспалительный процесс», который сопровождался дисбиозом в 15 (55%) случаях. Вместе с тем количественная оценка микробиоты влагалища при исследовании отделяемого со сводов методом real-time ПЦР выявила по критериям производителя дисбиотические состояния влагалищного биоценоза в 47 (82%) случаях. При этом в 22 (46,8%) случаях цитологически констатирована «цитограмма без особенностей», в 9 (19,2%) случаях – «не исключается бактериальный вагиноз». Полное совпадение результатов ПЦР и ЖЦ в констатации БВ имело место лишь в 16 (34%) случаях.

Полученные данные свидетельствуют о принципиальной разнице в спектре решаемых методами ПЦР и ЖЦ задач. Их смешение крайне затрудняет интерпретацию результатов и существенно снижает их диагностическую и соответственно, терапевтическую ценность.

*Д.А. Грядунов, Д.В. Зименков, Е.В. Кулагина, А.Т. Лейн-соо, Е.Е. Фесенко, Б.Л. Шаскольский, Р.Н. Гейдаров, Е.И. Дементьева, В.М. Михайлович, А.С. Заседателев. Комплексный анализ возбудителей инфекционных заболеваний на платформе гидрогелевых биочипов.* ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН), Москва

Идентификация возбудителя, вызвавшего инфекционное заболевание, установление его разновидности (типирование) и определение молекулярных детерминант устойчивости к химиопрепаратам с целью назначения адекватного режима терапии являются одним из ключевых аспектов персонализированной медицины. Целью настоящего исследования является разработка приложений для анализа бактериальных и вирусных геномов возбудителей социально-значимых заболеваний на основе оригинальной технологии гидрогелевых биочипов ИМБ РАН, оценка их диагностических характеристик и перспектив применения в лабораторной практике.

Биочипы ИМБ РАН состоят из массива ячеек гидрогеля объемом 0,1 нл, фиксированных на пластиковой подложке. Элементы биочипа содержат иммобилизованные олигонуклеотидные зонды, последовательности которых специфичны к фрагментам генов, мутациям и/или полиморфизмам, обеспечивающим идентификацию микроорганизма или вируса, установление генотипа, анализ вирулентности и лекарственной устойчивости. Процедура анализа включает обработку биологического образца, его флюоресцентное маркирование и гибридизацию на биочипе. Гибридизационную пробу, содержащую исследуемые фрагменты генома, готовят, как правило, методом мультиплексной ПЦР (ОТ-ПЦР при анализе РНК-содержащих вирусов) с одновременным включением флюоресцентной метки. Анализ результатов гибридизации на биочипе осуществляют в автоматическом режиме с использованием универсального аппаратно-программного комплекса, сравнивая интенсивности флюоресценции ячеек, с выдачей отчета о наличии/отсутствии в исследуемом образце специфичной мишени – ДНК/РНК микроорганизма/вируса; гена, продукт которого является фактором патогенности; мутации, приводящей к устойчивости к определенному химиопрепарату.

Разработан биочип и набор реагентов ТБ-ТЕСТ на его основе, предназначенный для выявления форм туберкулеза, отличающихся широкой лекарственной устойчивостью. Методика позволяет идентифицировать суммарно 114 генетических детерминант устойчивости к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, инъекционным аминогликозидам, капреомицину и этамбутолу, с одновременным установле-

нием генотипа эндемичных для РФ штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, таких как Beijing, Beijing B0/W148, Haarlem, LAM, Ural. Диагностические чувствительность и специфичность набора реагентов ТБ-ТЕСТ, определенные на достаточно большой выборке клинических образцов и культур с различными профилями устойчивости, составили: по рифампицину – 97,4% и 96,2%, по изониазиду – 98% и 91,5%; по фторхинолонам – 94,1% и 85,2%; по аминогликозидам и капреомицину – 95,1% и 86,4%; по этамбутолу – 67,4% и 90,5%, соответственно.

Разработан набор реагентов БИОГРИПП для комплексного анализа генома вируса гриппа. Биочип, входящий в состав набора, позволяет определять типы А и В вируса, а также субтипировать вирус гриппа А с идентификацией всех известных молекулярных вариантов гемагглютинина и нейраминидазы (Н1–Н16, N1–N9). Клиническая часть биочипа отвечает за определение генетических маркеров устойчивости к противовирусным препаратам (амантадин, ремантадин, тамифлю) и мутаций в генах, кодирующих вирусные белки PB1-F2 и NS1, которые способны ослаблять иммунный ответ инфицированного организма.

Предложен метод определения нуклеотидной последовательности области NS5B генома вируса гепатита С (ВГС) на основе биочипа, позволяющий идентифицировать 6 генотипов и 36 различных подтипов ВГС. Совпадение с «золотым

стандартом» генотипирования ВГС – секвенированием области NS5B с последующим филогенетическим анализом – при анализе 345 образцов плазмы крови составило 100% при идентификации генотипа и 99,7% в отношении идентификации подтипа ВГС.

В настоящий момент технология биочипов представляется одним из наиболее эффективных инструментов персонализированной медицины, обеспечивая не только идентификацию возбудителя, но и анализ генетических детерминант с целью установления адекватного режима терапии. Так, данные, полученные с использованием набора ТБ-ТЕСТ при анализе клинического материала, поступающего от пациентов, дают возможность своевременно назначать соответствующую терапию по широкому спектру препаратов, корректировать ее в процессе лечения, а также предотвращать распространение особо опасных форм *M. tuberculosis*. Набор реагентов БИОГРИПП может использоваться эпидемиологическими службами для быстрой расшифровки всплеск гриппа, а также лабораториями инфекционных больниц для выбора рациональных противовирусных препаратов при осложненном течении заболевания. Установление генотипа ВГС необходимо для назначения курса терапии рибавирином и интерфероном, в то время как ответ на противовирусное лечение гепатита С новыми препаратами – ингибиторами протеазы и РНК-полимеразы во многом зависит от подтипа ВГС.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ПРОБЛЕМАМ КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

*Г.И. Алексеева, Е.И. Ермолаева, А.П. Рожина, Т.Б. Павлова.* **Аспекты развития лабораторной диагностики туберкулеза в Республике Саха (Якутия).** ГБУ РС (Я) Научно-практический центр «Фтизиатрия», Якутск

В последние годы происходят существенные изменения в методической базе клинических лабораторных исследований для выявления возбудителя туберкулеза. В действующих директивных документах указано, что в комплекс микробиологического исследования для изоляции этиологического агента включаются и микроскопические методы. Бактериоскопическое исследование мазков мокроты с целью обнаружения кислотоустойчивых микобактерий (КУМ) технически простая, недорогая методика, с небольшими затратами времени, позволяющая оперативно выявлять больных с заразными формами туберкулеза и оценить эффективность проводимой химиотерапии.

Целью работы явился анализ проведения микробиологических исследований в лабораториях Республики Саха (Якутия). Проанализированы результаты положительной микроскопии по данным клиничко-диагностических лабораторий муниципальных образований г. Якутска, у 122 пациентов, а также у 750 больных с положительным результатом люминесцентной микроскопии по данным бактериологической лаборатории научно-практического центра «Фтизиатрия», результаты посева и тестов на лекарственную чувствительность к основным противотуберкулезным препаратам.

Установлено, что наиболее часто у 40,2% (49) пациентов обнаруживали умеренное количество КУМ; у 38,5% (47) единичные, реже – у 21,3% (26) пациентов – значительное количество КУМ. Сопоставление данных бактериоскопии с данными посева выявила следующее: чаще положительный посев регистрировался у больных с наличием в мокроте единичных КУМ в 83% (39); с умеренным количеством КУМ в 78,6% (39) и в 73,1% (19) случаев со значительным количеством КУМ. Таким образом, из 122 больных с положительным результатом бактериоскопии в 79,5% (97 больных) случаев выделены культуры микобактерий туберкулеза (МБТ). Для сравнения, по данным микробиологической лаборатории у 750 больных с положительным результатом люминесцентной микроскопии в 97,6% случаев обнаружены МБТ методом посева на плот-

ных яичных средах, что на 17,8% чаще, чем обнаруживается с помощью бактериоскопии по Ziehl-Neelsen. Причина такой разницы в том, что метод люминесцентной микроскопии более чувствительный по сравнению с простой бактериоскопией, кроме того, бактериоскопия по Ziehl-Neelsen и посев проводятся не из одной порции диагностического материала и в разных лабораториях. Но, тем не менее, метод простой бактериоскопии позволяет оперативно выявить эпидемически опасных больных туберкулезом, в том числе, выделяющих лекарственноустойчивые штаммы *M. tuberculosis*. Из 97 больных с бактериоскопически позитивным результатом в 48,5% (49) выделены штаммы МБТ устойчивые к противотуберкулезным препаратам. Чаще резистентные МБТ выявлялись у больных со значительным количеством КУМ в 78,9% (15 из 19), реже у больных с единичными КУМ в 51,3% (20 из 39) и с умеренным количеством КУМ в 38,5% (15 из 39) случаев. Обращает внимание, что МБТ с множественной лекарственной устойчивостью также чаще регистрировались у больных со значительным количеством КУМ в 68,4% (13 из 15); реже у больных с умеренным КУМ в 28,2% (11 из 39) и с единичными КУМ в 33,3% (13 из 15) случаев. Таким образом, микроскопический метод Ziehl-Neelsen сохраняет свою актуальность, но при этом современные реалии требуют использования более чувствительных методов лабораторной диагностики туберкулеза. Этим критериям соответствуют метод люминесцентной микроскопии и молекулярно-генетический метод с использованием системы GeneXpert Dx. Настоящее состояние материально-технической базы и кадровый потенциал клиничко-диагностических лабораторий Республики Саха (Якутия) позволяют внедрить эти исследования в практику учреждений первичной медико-санитарной помощи.

*И.В. Андриянов, И.А. Каширцева, С.Г. Вахрушев, О.Э. Казакова.* **Масс-спектрометрия микробных маркеров в практике врача ЛОР.** Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого

В последние годы отмечается стойкая отрицательная динамика распространенности хронического аденоидита, с 2–9% в 1950 гг. до 76% в наши дни. В литературе все чаще обсуждается вопрос об изменении тактики диагностики и лечения инфекционных заболеваний верхних дыхательных