

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБОВ И СРЕДСТВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Е.Н. Ильина. Молекулярные средства измерения в современной микробиологической лаборатории. НИИ ФХМ ФМБА России, Москва

Интенсивное развитие технологий анализа биологических объектов, в частности возникновение и совершенствование инструментов чтения генетических текстов, создание спектра методов обнаружения и расшифровки структуры природных биополимеров, к числу которых относятся молекулы ДНК, РНК и белки, существенно расширили наши возможности в исследовании микроорганизмов, в том числе возбудителей инфекционных заболеваний человека.

В области клинической и прикладной микробиологии принципиально изменились представления о скорости мутационных процессов, изменчивости геномов бактерий и вирусов, и как следствие формировании устойчивости к применяемым химиотерапевтическим препаратам. В последние годы возникла реальная возможность принципиальной модернизации диагностического потенциала бактериологических лабораторий путем внедрения методов молекулярного анализа, которые способны повысить точность идентификации возбудителя, дать исчерпывающее представление о микробном сообществе в испытуемой пробе и определить клинически значимые свойства микроорганизмов в максимально сжатые сроки.

Традиционные методы идентификации возбудителей, основанные на проведении микробиологического посева, не лишены ряда недостатков – длительность исследования, лимитированная скоростью деления бактериальной клетки, относительная дороговизна метода, необходимость привлечения большого числа квалифицированных специалистов в силу сложности автоматизации аналитических процедур. Кроме того, значительная часть патогенных микроорганизмов, в частности представители анаэробной бактериальной флоры, являются трудно культивируемыми или некультивируемыми и фактически не анализируются в большинстве клинических микробиологических лабораторий.

Сходство молекулярной организации микробной флоры, универсальность механизмов, реализуемых бактериальной клеткой при формировании лекарственной устойчивости, технологическая общность современных измерительных методов анализа биомолекул легли в основу концепции о возможности создания единого аналитического комплекса, предназначенного для идентификации и типирования бактериальных патогенов на молекулярном уровне.

Как показала практика, сочетание методов исследования белковых маркеров (всевозможные ИФА-тесты) с детекцией ДНК (ПЦР-диагностика) позволило существенно повысить совокупный диагностический потенциал клинико-лабораторного тестирования. Сегодня как средство модернизации бактериологической лаборатории, мы предлагаем внедрение протеомного анализа (МАЛДИ масс-спектрометрия) и генетического тестирования (ПЦР), направленных:

- на повышение точности видовой идентификации возбудителей (МАЛДИ масс-спектрометрия),
- на расширение информативности бактериологического тестирования за счет обнаружения некультивируемой анаэробной флоры (ПЦР), выявления генетических детерминант лекарственной устойчивости (ПЦР), оценки патогенности/токсикогенности бактериальной флоры (ПЦР).

Предлагаемые методы геномно-протеомной характеристики патогенов, применяемые наравне с классическим бактериологическим посевом, повышают успешность диагностического поиска, с одной стороны, и способствуют накоплению новых знаний в области молекулярной микробиологии, в частности в сфере расшифровки механизмов формирования патогенного потенциала и лекарственной устойчивости бактерий – с другой.

И.А. Парфенов. Повышение информативности бактериального посева за счет ПЦР-идентификации анаэробной флоры. ООО НПФ «Литех», Москва

Цель настоящего исследования – повысить информативность бактериального посева, используя дополнительные методы тестирования биоматериала. Согласно поставленной цели, была

сформулирована следующая задача – разработать панели тестов по определению клинически значимых возбудителей анаэробных инфекций методом ПЦР (полимеразной цепной реакции).

Бактериальный посев долгое время считался «золотым стандартом» диагностики микроорганизмов. В то же время он зачастую являлся и безальтернативным методом. Однако в последнее время появляется большое количество новых методов, позволяющих повысить качество бактериологического исследования, в первую очередь в области выявления и идентификации микроорганизмов. Одним из них является метод ПЦР. Он позволяет в короткие сроки выявлять труднокультивируемые микроорганизмы, особое внимание среди которых занимают анаэробные бактерии. Сложности в их диагностике заключаются как в необходимости длительного и рутинного исследования, так и в наличии специального оборудования и реагентов. Ввиду объективных причин при диагностике анаэробных микроорганизмов бактериологическим исследованием существует риск получения недостоверных результатов.

Как известно, в норме в организме человека присутствует большое количество анаэробов, которые могут стать причиной воспалительных процессов при попадании на стерильные органы и ткани. Однако точную долю заболеваний, вызванных анаэробными микроорганизмами, трудно определить в связи с неправильными методами сбора материала, транспортировкой и культивированием. Метод ПЦР позволяет избежать данных ошибок, тем самым повышая информативность исследования.

Результатом работы стали разработка панелей по выявлению в клиническом материале возбудителей анаэробных инфекций методом ПЦР, а также выявление генетически обусловленной патогенности и антибиотикорезистентности. В рамках проведенных исследований разработаны комплексные панели для диагностики бактерий рода *Bacteroides*, включающих как видовую идентификацию (*Bacteroides caccae*, *distasonis*, *merdae*, *eggerthii*, *stercoris*, *uniformis*, *fragilis*, *vulgatus*, *thetaiomicron*, *ovatus*), так и оценку патогенного потенциала выявленных микробов на основании учета признака продукции BFT-токсина. На идентификацию анаэробной флоры направлены тест-системы, составляющие «стоматологическую панель» и позволяющие выявить *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*.

Мы верим, что комплексная диагностика возбудителей анаэробных микроорганизмов с использованием панелей ООО НПФ «Литех» позволит существенно повысить эффективность и сократить время диагностических исследований.

Е.С. Лисицына. Обнаружение генетически-детерминированной лекарственной устойчивости бактерий. ООО НПФ «Литех», Москва

Цель настоящего исследования – повысить информативность микробиологических методов определения антибиотикочувствительности, используя дополнительные способы тестирования биоматериала. Согласно поставленной цели, была сформулирована следующая задача – разработать панели тестов для выявления генетических детерминант резистентности клинически значимых возбудителей инфекций методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Классическое бактериологическое исследование чувствительности к антибиотикам считается «золотым стандартом» диагностики. Однако такое исследование длительно, доступно только для культивируемых бактерий, не всегда позволяет локализовать источник наблюдаемой резистентности и оценить тенденции её распространения. Поэтому клиническая микробиологическая диагностика все чаще обращается к молекулярным методам определения устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, в частности к методу ПЦР.

Одним из основных механизмов возникновения резистентности у бактерий является наличие определенных генов, отвечающих за изменение метаболических путей клетки, выработку ферментов, гидролизующих антибиотики или модифицирующих

мишены их действия. Метод ПЦР позволяет проводить идентификацию генов-детерминант резистентности микроорганизмов в короткие сроки, отличается высокой точностью и меньшими требованиями к забору материала. Определение антибиотикорезистентности с помощью ПЦР позволяет спрогнозировать появление устойчивости к различным группам антимикробных препаратов, а также оценить распространение резистентных штаммов на локальном и региональном уровне.

Результатом работы стала разработка панелей по выявлению в клиническом материале генетически обусловленной лекарственной устойчивости бактерий методом ПЦР. В рамках проведенных исследований разработаны тест-системы, позволяющие детектировать генетические детерминанты резистентности бактерий, обуславливающие устойчивость к β-лактамам антибиотикам пенициллинового ряда (гены TEM, SHV-1,11), к β-лактамам антибиотикам цефалоспоринового ряда (гены CTX-M, SHV-5,12), к карбапенемам (гены VIM, NDM, KPC, OXA-23, OXA-48), к β-лактамам антибиотикам у стафилококков (ген MecA), к гликопептидам у энтерококков (гены VanA, VanB), к макролидам у стафилококков и стрептококков (гены Erm, Mef).

Таким образом, использование панелей ООО НПФ "Литех" для определения генетически-детерминированной лекарственной устойчивости позволит повысить эффективность и информативность диагностических исследований, а также существенно сократить время, необходимое для их проведения, что в итоге будет способствовать выбору адекватной лекарственной терапии.

О.И. Кречикова. Роль микробиологических лабораторий в инфекционном контроле. НИИ антимикробной химиотерапии, ГБОУ ВПО Смоленская государственная медицинская академия Минздрава России

В системе инфекционного контроля (ИК) в лечебных учреждениях большое значение имеют бактериологические исследования, позволяющие выявлять и оценивать эпидемиологические особенности циркулирующих микроорганизмов, в том числе распространённость полирезистентных штаммов с необычными механизмами резистентности. С внедрением в лаборатории современного оборудования и программ, обеспечивающих сохранение базы данных и выполнение эпидемиологического анализа, влияние бактериологических исследований на результативность ИК значительно повышается.

Цель работы – оценить циркулирующую микрофлору в многопрофильном стационаре Смоленска за период с января по март 2013 г. включительно.

В лабораторию поступали образцы биологического материала (материалы из нижних дыхательных путей, раневое отделяемое, моча) из отделения интенсивной хирургии, хирургического отделения раневой инфекции, урологического отделения. Исследования выполнялись по принятой в лаборатории методике. Идентификация микроорганизмов (МО) проводилась методом время-пролётной масс-спектрометрии (Microflexaldi Biotyper 2.0, "Bruker Daltonics", Германия). Чувствительность микроорганизмов определяли дискодиффузионным методом на среде Мюллер-Хинтона (OXOID, Англия). Результаты учитывали на анализаторе ADAGIO ("Bio-Rad", Франция) с использованием экспертной системы анализатора и интерпретацией по критериям CLSI 2012 г. В программу вводилась необходимая для последующего анализа информация по исследованным клиническим образцам.

За анализируемый период исследовано 196 образцов, в 65 образцах выявлен рост предположительно клинически значимых МО – 70 штаммов, преобладали грамотрицательные МО – 63 (90%). Всего выделено пять видов энтеробактерий – 40 штаммов (57,1% из 70), *Acinetobacter baumannii* – 16 (22,9%), *Pseudomonas aeruginosa* – 7 (10%), *Staphylococcus aureus* – 7 (10%). Выявлена широкая циркуляция энтеробактерий, продуцирующих β-лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС) – 23 (57,5% из 40), в том числе *Escherichia coli* – 9, *Klebsiella pneumoniae* – 12. Среди энтеробактерий не выявлены штаммы со сниженной чувствительностью к карбапенемам.

Из 16 штаммов *A.baumannii* 12 (75%) были резистентными к карбапенемам. Продукция металло-β-лактамаз у этих штаммов не выявлена.

У 3 штаммов *P.aeruginosa*, резистентных к карбапенемам, также

не выявлена продукция металло-β-лактамаз. У грамотрицательных микроорганизмов выявлен высокий уровень резистентности к ципрофлоксацину (45/63 – 71,4%) и гентамицину (37/63 – 58,7%). Из 7 штаммов *S.aureus* только один был метициллинрезистентный.

Вывод. Мониторинг циркулирующей микрофлоры с использованием программного обеспечения ADAGIO показал широкое распространение полирезистентных микроорганизмов. Для дальнейшего развития системы ИК необходимо внедрение современного оборудования и обеспечение бактериологических лабораторий программами для сохранения базы данных и эпидемиологического анализа, а также внедрения молекулярно-генетических методов изучения механизмов резистентности и эпидемиологии распространения полирезистентных штаммов.

В.Е. Колупаев, Н.А. Попова, А. Барело. Методы тестирования антибиотикорезистентности в соответствии с современными мировыми стандартами. Автоматизация эпидемиологического надзора и контроль за антибиотикорезистентностью. Анализатор ДДМ "Адажио". «Био-Рад Лаборатории», Москва, «Био-Рад Лаборатории», Париж

Экономические потери от нерационального использования антибиотиков по всему миру достигают огромных цифр. По данным CDC, только в США эта цифра составляет 4–4,5 млрд долларов в год. Использование экспертных систем позволяет снизить себестоимость лечения за счет более эффективной терапии и экономически обоснованной оптимизации применения дорогостоящих препаратов.

Для определения чувствительности в большинстве российских лабораторий используется дискодиффузионный метод. Тестирование с использованием этого метода является технологически простым, результаты хорошо воспроизводимы, метод легко адаптируется к потребностям конкретного учреждения, быстро реагирует на появление на рынке новых препаратов. До недавнего времени достаточно трудоемким и трудозатратным был этап обработки полученных этим методом результатов и составления эпидемиологических отчетов.

Анализатор антибиотикограмм ДДМ «Адажио» предназначен для объединения усилий клинического и лабораторного звена с целью повышения эффективности использования антибиотиков и сдерживания нарастающей антибиотикорезистентности. Принцип работы прибора заключается в автоматическом считывании зон задержки роста на чашке Петри с последующей интерпретацией и комплексным анализом полученных данных. Прибор представляет собой детектирующий блок и аналитическую систему на основе персонального компьютера.

Считывание чашки происходит автоматически за несколько секунд. После этого прибор определяет зоны ингибирования и выдает заключение в соответствии с внутренней базой данных, содержащей предзагруженные стандарты CLSI и Eucast. На основе этих данных прибор рассчитывает минимальную ингибирующую концентрацию по критериям CLSI, Eucast и дает заключение о резистентности.

Автоматически проводится экспертная оценка правильности результатов в сравнении с базой данных резистентных штаммов Института Пастера (Париж) и выдаются сообщения о невозможных или маловероятных фенотипах.

Все результаты исследований заносятся в базу данных. По мере их накопления появляется возможность проводить анализ и эффективно решать практические задачи лечебного учреждения, связанные с применением антибиотиков.

К несомненным преимуществам прибора относится русскоязычное программное обеспечение, возможность свободно выбирать антибиотики для тестирования в соответствие с формуляром препаратов, используемых в учреждении; составлять панели для определения сложных фенотипов (например, БЛРС) уверенная работа со всеми типами агаров, используемых для ДДМ, а также возможность проводить регулярную модернизацию системы интерпретации и экспертизы получаемых результатов в соответствии с международными рекомендациями.

Система имеет возможность обмена данными, полученными на аналогичном оборудовании в других лабораториях. Это позволяет создавать единые региональные базы данных, на основании которых можно проводить масштабный мониторинг резистентности эпидемически значимых возбудителей.