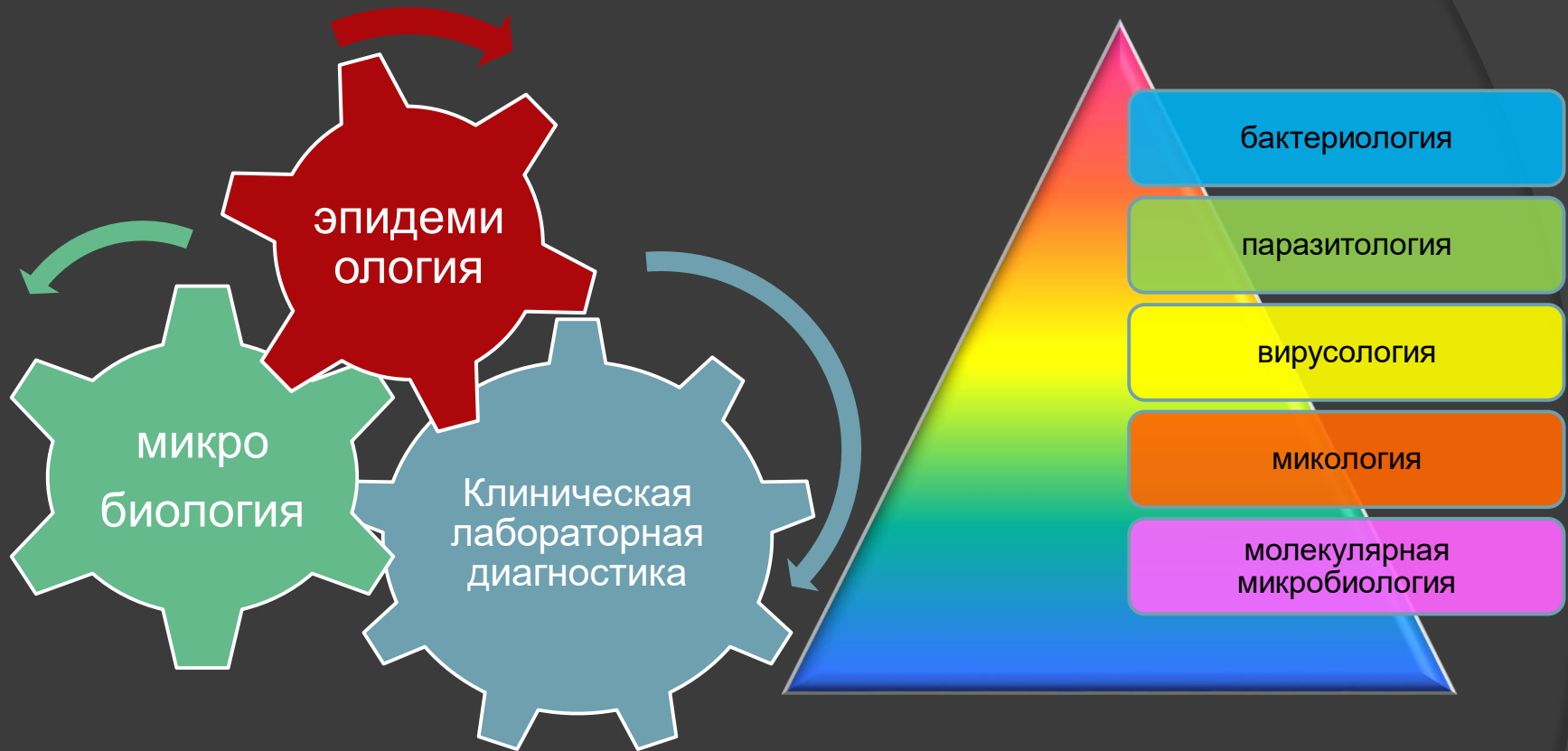


# СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

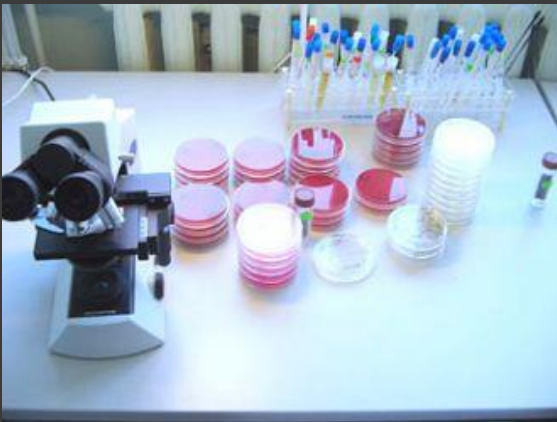
Лебедева Оксана Викторовна  
Зав. бактериологической лабораторией  
ФГБУЗ СМКЦ им. Н.А.Семашко ФМБА России,  
к.м.н. доцент

# Медицинская микробиология



*Медицинская микробиология изучает морфологию, физиологию обмена веществ, факторы патогенности и механизмы их реализации на клеточном и молекулярно-генетическом уровне у возбудителей инфекционных заболеваний человека и разработкой специфических методов их диагностики, лечения и профилактики.*

- Медицинская помощь по разделу «бактериология» является неотъемлемой **частью** оказания медицинской помощи по профилю «клиническая лабораторная диагностика», но обладает определенными **отличиями**.
- Основным отличием является необходимость, помимо характеристики внутренней среды организма пациента, **выделение** возбудителя инфекционного заболевания (бактерии, вирусы, грибы, простейшие) и(или) выявление и **идентификация** генетических детерминант, определяющих патогенность возбудителя и **устойчивость** к антимикробным препаратам.



- Расширение круга патогенных для человека микроорганизмов
- Диагностика на базе современных геномных и постгеномных технологий
- Новые подходы к созданию вакцин
- Глобализация проблемы антибиотикорезистентности
- Персистенция : хронические и атипичные формы инфекционного процесса, биопленки
- Возвращающиеся и вновь появляющиеся инфекции
- Актуальность вирусных инфекций
- Рост инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи

**Микробиологические исследования должны иметь приоритетное развитие среди других видов лабораторной диагностики.**

КОНЦЕПЦИЯ развития службы  
клинической лабораторной диагностики  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

# Основные проблемы клинической микробиологии:

## Организационные

- Кадровый потенциал
- Оптимизация функций

## Материально-технические

- Оснащение рабочего процесса
- Автоматизация

## Научно-методические

- Нормативная база
- Правовое сопровождение

# Кадровый потенциал:

2005 год

2015 год

- самостоятельных бактериологических (микробиологических) лабораторий:

1015 (21%)

480 (9%)

Снижение количества бактериологических лабораторий на 53,7%

- бактериологических отделов в составе КДЛ:

4718

6380

Рост количества клинических лабораторий на 16,4%

- врачи-бактериологи 5-6 тысяч  
врачи КЛД – 30 тысяч

# Лабораторная служба АО (2018)

173 специалиста с высшим образованием

медицинским

- Врачи КЛД – 149
- Врачи-бактериологи – 22
- Врачи лабораторной генетики – 2

не медицинским

- Врачи-лаборанты – 2
- Биологи – 6

Укомплектованность 67,3%

700 специалистов со средним медицинским образованием

- Медицинский лабораторные техники – 696
- Лаборанты – 4

Укомплектованность 71%

# Оптимизация функций:

- Оптимизация **перечня показаний** для микробиологического исследования клинического материала и объектов больничной среды
- Оптимизация **системы забора и доставки** образцов биологического материала в лабораторию
- Совершенствование и унификация **методов** выделения и идентификации возбудителей ИСМП
- **Расшифровка генома** актуальных возбудителей ИСМП, циркулирующих в учреждениях здравоохранения
- Разработка и внедрение **экспресс – методов** микробиологической диагностики ИСМП
- Обеспечение преемственности между этиологической расшифровкой ИСМП и клинической **интерпретацией** полученных результатов



# Оснащение рабочего процесса

Для других типов клинических исследований полностью автоматические лаборатории появились 15-25 лет назад. Микробиологические лаборатории в этом отстают.



**Гематология**



**Иммунология**



**Клиническая  
биохимия**

Практически разрушена отечественная индустрия обеспечения бактериологических лабораторий специализированными средами.

# РОЛЬ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ИНДУСТРИИ В МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОМ ОБЕСПЕЧЕНИИ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

- ❖ Доля отечественной продукции в секторе рынка **аналитических приборов** не превышает 10%
- ❖ Доля отечественной продукции в секторе рынка специализированных **наборов реагентов** и расходных материалов для клинико-диагностических исследований не превышает 30%
- ❖ Доля отечественной продукции в секторе рынка **вспомогательного оборудования** составляет примерно 50%
- ❖ Продолжается рост цен на импортные лабораторные товары , что создает серьезные проблемы и может привести к сокращению объемов клинико-лабораторных исследований.
- ❖ **Импортозамещение является ключевым вопросом в обеспечении стабильной работы лабораторной службы, вне зависимости от валютных курсов**



# Полная автоматизация микробиологических исследований



В России автоматизация микробиологических исследований проходит: либо в рамках общей **централизации** лабораторной медицины либо в рамках **развития специализированных** приоритетных направлений медицины (онкология, трансплантология, гематология, перинатальная и неонатальная патология).

# Совершенствование нормативного и правового обеспечения:

- Создание **методической базы** для наиболее актуальных массовых исследований:
  - стандартизация микробиологических процедур и методик
  - инфекции связанные с оказанием медицинской помощи
  - ВИЧ инфекция и гепатиты
  - антибиотикорезистентность
  - респираторные и кишечные инфекции
  - оппортунистические инфекции
- Разработка, утверждение и внедрение **национальных стандартов и клинических рекомендаций**;
- Создание документов, отражающих **юридические аспекты** проблемы микробиологической службы.

# Основные тенденции развития современной микробиологии

- ⦿ Автоматизация
- ⦿ Централизация
- ⦿ Внедрение молекулярно-генетических методов исследований
- ⦿ Внедрение экспресс -методов ( point of care) «у постели больного»

# В чем причина медленной автоматизации микробиологических лабораторий?



- **Сложные образцы**
  - Разнообразиие типов и объемов образцов
  - Множество тестов для одного образца
- **Сложная обработка**
  - Сложные протоколы, включающие ручные операции
  - Зависимость от квалификации операторов
- **Низкая эффективность**
  - Отложенная обработка, тестирование группами
  - Культуры проверяются один раз в сутки
  - Много вспомогательных операций (например, проверка чашек без признаков роста, субкультивирование, повторные тесты ID/AST)

Возможность автоматизации отдельных процессов для ускорения работы и повышения точности

- Автоматизированные системы гемокультивирования
- Автоматизированные системы идентификации и определения чувствительности к антибиотикам
- Масс-спектрометрия MALDI-TOF/TOF для идентификации микроорганизмов
- Молекулярные системы для выявления и идентификации микроорганизмов



# Основные группы методов используемых для диагностики инфекционных болезней

- Микроскопические
- Культуральные (питательные среды)
- Иммуносерологические (РИФ, ИФА)
- Молекулярно-генетические (ПЦР, чипы и др.)
- Экспресс методы («point of care» - у постели больного)



# Достоинства и недостатки различных методов лабораторной диагностики

	Микроскопия	Культуральный	ИФА	ПЦР
Что определяет метод	непосредственно возбудителя (прямой)	непосредственно возбудителя (прямой)	антитела или антигены (непрямой)	нуклеиновую кислоту (прямой)
Сложность проведения метода	простой	сложный	сложный	сложный
Быстрота получения результата	быстро	медленно	относительно быстро	относительно быстро
Чувствительность	низкая	высокая	высокая	очень высокая
Специфичность	низкая	очень высокая	удовлетворительная	очень высокая
Субъективность интерпретации результатов	субъективный	чаще субъективная	объективная	объективная

# Микроскопический метод

- Приготовление препарата для изучения микроорганизмов в **нативном** виде.
  - Метод «висячей капли».
  - Метод «раздавленной» капли.
- Приготовление **фиксированных** препаратов-мазков.



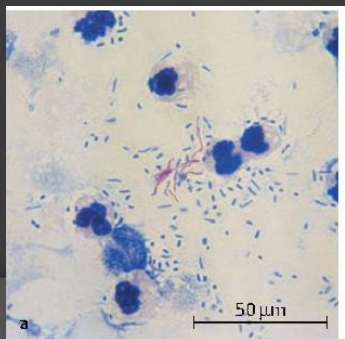
## МЕТОДЫ ОКРАСКИ МАЗКОВ

### ➤ **Простой метод.**

Фиксированный мазок окрасить каким-либо одним красителем, например фуксином водным (1-2 мин) или метиленовым синим (3-5 мин).

### ➤ **Сложные методы.**

Последовательно нанести на препарат определенные красители, различающиеся по химическому составу и цвету, протравы, спирты, кислоты, что позволяет выявить определенные структуры клеток и дифференцировать одни виды микроорганизмов от других ( по Граму, Нейссеру, Циль-Нильсену, Романовскому-Гимза)



# Микробиологический метод исследования

- Отбор и доставка материала в лабораторию.
- Культуральные методы исследования (посев).
- Идентификация бактерий и определение факторов патогенности
- Определение чувствительности выделенных культур к а/б препаратам.

## Особенности метода:

- Метод является «золотым стандартом»
- Высокая зависимость от преаналитического этапа (отбор и доставка материала в лабораторию).
- Длительность проведения исследования

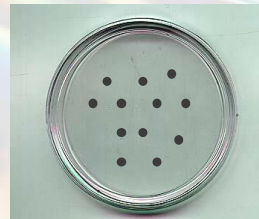
# Схема бактериологического анализа

1 этап

*Посев исследуемого материала на чашки с дифференциально-диагностическими средами*



Посев  
инкубация

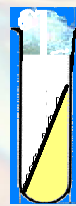


2 этап

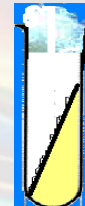
*Снятие отдельных колоний и накопление чистой культуры с первичной дифференциацией на комбинированных питательных средах*

Исследуемый материал

Дифференциально-диагностическая среда



ПА



СА

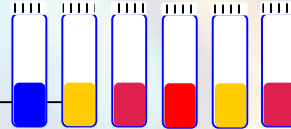
Среда  
Олькеницкого



3 этап

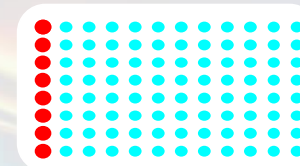
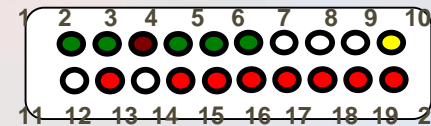
*Полная идентификация выделенной культуры по комплексу биохимических признаков, антигенной структуре, отношению к специфическим бактериофагам и антибиотикам*

От 24ч до  
нескольких  
суток.



Классические  
пробирочные среды

ИЛИ  
18-24 ч



Окраска по Граму



Тест на оксидазу



Коммерческие наборы для  
биохимической идентификации

ПБДЭ  
ПБДС  
СИБ  
(Имбио)

Лахема (Чехия)  
АРІ (Франция)  
МТС (Махачкала)  
ММТ (Ставрополь)  
ДС-ДИФ-ЭНТЕРО-12  
ДС-ДИФ-ЭНТЕРО-24

Оценка результатов

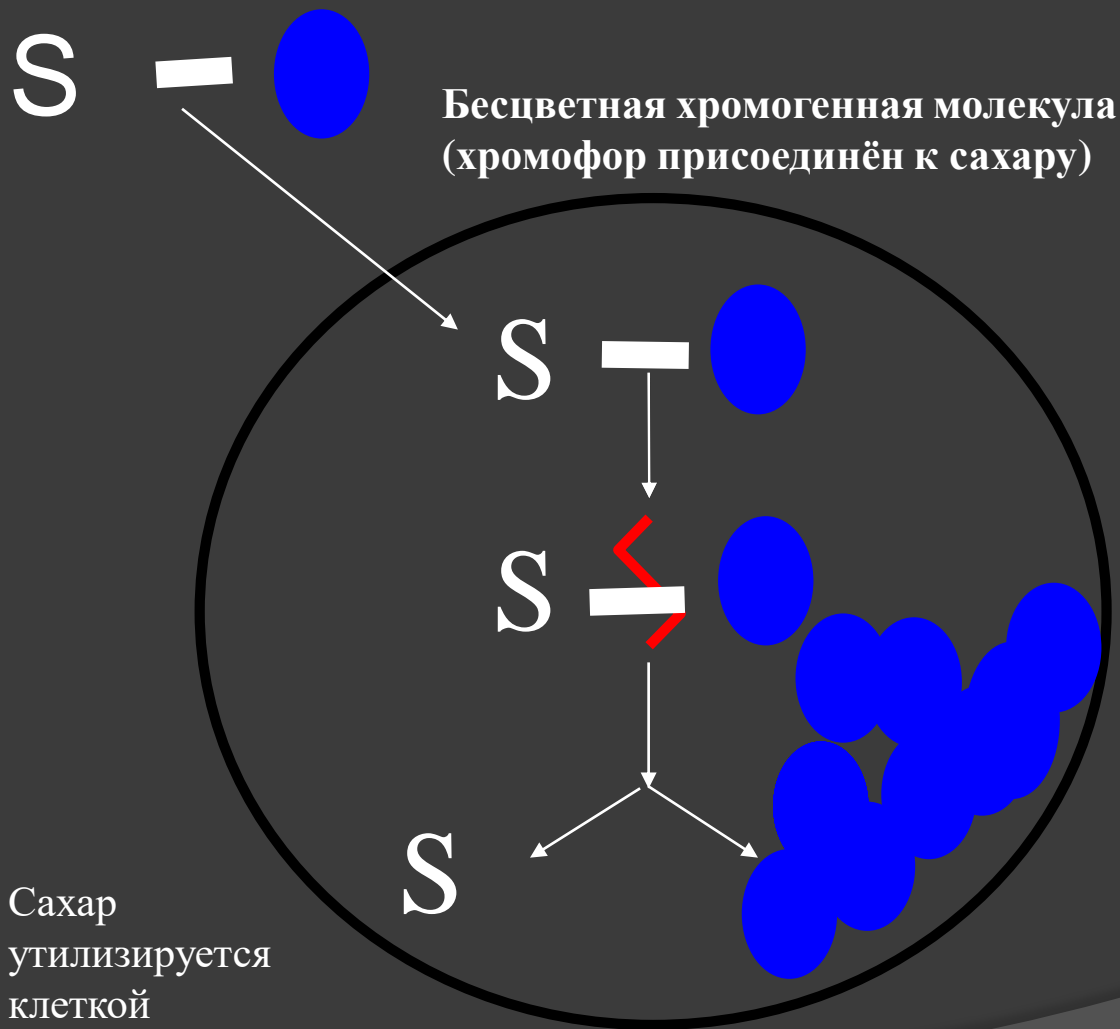


# Хромогенные среды

- принцип действия основан на выявлении высокоспецифичных ферментов у искомым микроорганизмов.
- предназначены для быстрого (в течение 24 часов) обнаружения в исследуемом материале целого ряда микроорганизмов, имеющих этиологическое значение.



# Механизм специфической хромогенной цветной реакции



Хромогенная молекула захватывается клеткой

Под действием фермента м/организма молекула хромогена расщепляется, хромофор высвобождается и окрашивается характерным цветом

Окрашенный хромоген (нерастворимый) накапливается в растущей клетке

# Виды хромогенных сред

## 1. среды для селективного выделения и прямой идентификации микроорганизмов

- **клинических образцах**
  - уропатогены
  - грибы рода Кандида
  - сальмонеллы
  - золотистый стафилококк
  - стрептококк гр. В
  - кишечная палочка O157
- **санитарной микробиологии**
  - кампилобактерии
  - энтеробактер саказаки
  - БГКП в пищевых продуктах и воде
  - КОС в пищевых продуктах
  - бациллу цереус
  - листерии

## 2. среды для скрининга на полирезистентные микроорганизмы

- метициллинрезистентные золотистые стафилококки;
- энтерококки с приобретенной устойчивостью к ванкомицину;
- энтеробактерии, продуцирующие БЛРС;
- карбапенем-резистентные энтеробактерии.

# Иммуносерологические методы

В основе иммунологических методов лежат **серологические реакции**, для постановки которых используют сыворотку (serum), содержащую антитела (основаны на взаимодействии антигенов и антител) и **клеточные реакции**, базирующиеся на взаимодействии антигенов (аллергенов) с Т-клетками.

Серологические реакции в микробиологических лабораториях используют в двух **целях**:

1) для **серодиагностики** - определения природы антитела в сыворотке крови больного при бактериальных, вирусных, реже других инфекционных заболеваниях с помощью известного антигена (**диагностикума**).

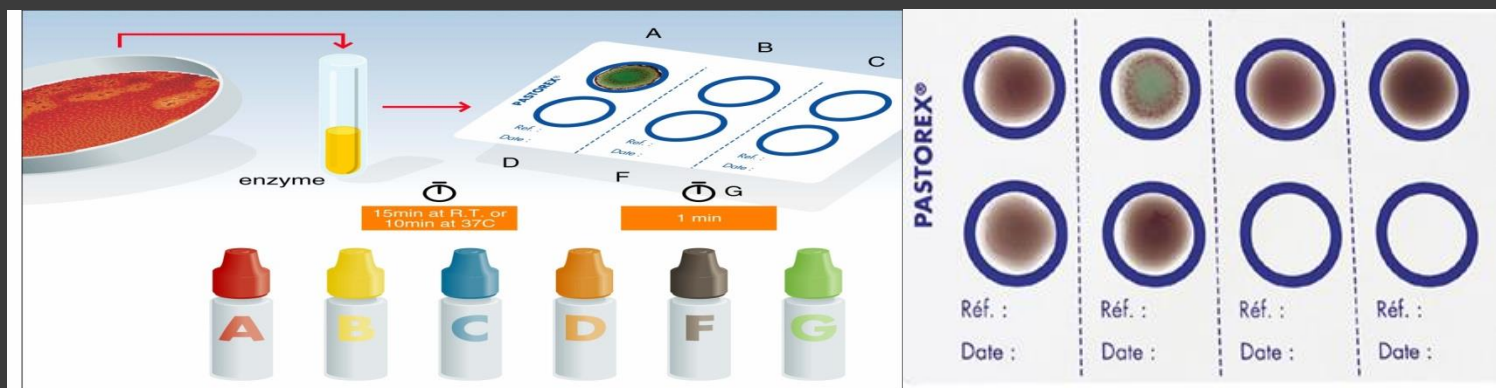
## Чувствительность методов серологических реакций.

МЕТОДЫ	ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ, г/мл.
Реакция преципитации	10/4 – 10/6
Реакция агглютинации	10/6 – 10/7
Реакция связывания комплемента	10/6
Реакция пассивной гемагглютинации	10/7 – 10/9
Реакция иммунофлуоресценции	10/7
Реакция коагглютинации	10/8 – 10/9
Иммуноферментный анализ	10/6 – 10/7
Радиоиммунный анализ	10/9 и менее
Иммуноблотинг	10/7 – 10/9

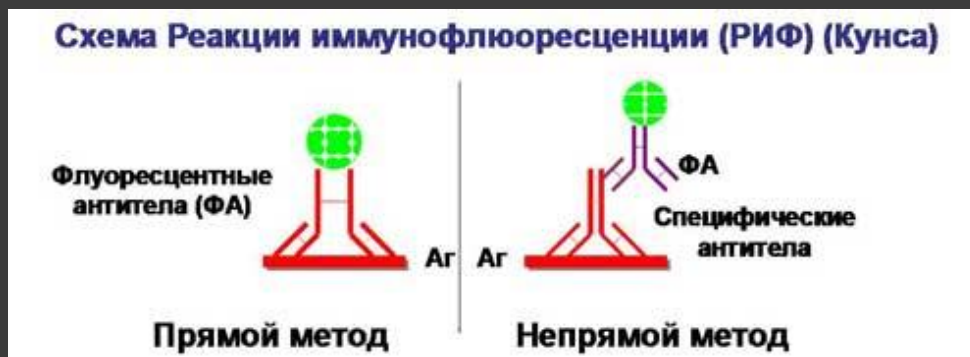
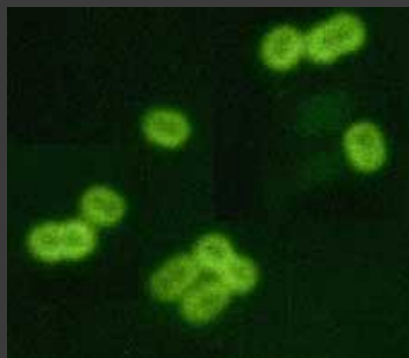


2) для **серотификации** микроорганизмов, токсинов, антигена вообще с помощью известного антитела (**иммунной диагностической сыворотки**) для определения родовой, видовой и типовой принадлежности антигена

## Латекс агглютинация



## Реакции с применением меченных АТ (РИФ)



# Иммуноферментный анализ (ИФА)

- В основе иммуноферментного анализа лежит известная иммунная реакция антигена и антитела. Один из этих реагентов является определяемым веществом, а другой - узнающим, обладающим известной стандартной специфичностью (избирательностью) по отношению к определяемому веществу.
- Для выявления образовавшихся иммунных комплексов (антиген-антитело) используется **фермент**, которым предварительно метится узнающий компонент (антиген или антитело). Сам фермент, естественно, не виден, поэтому визуализация присутствия вещества, определяемого методом ИФА, достигается применением посредника - **хромогена**. Это особое химическое соединение, которое хорошо растворимо в воде, и раствор которого бесцветен.
- Превращение бесцветного хромогена в **цветное вещество хромофор** происходит под действием фермента, для которого хромоген является субстратом.



# Преимущества ИФА:

- **высокая чувствительность**, позволяющая выявлять концентрации до 0,05нг/мл. Такая чувствительность метода определяется способностью одной молекулы фермента катализировать превращение большого числа молекул субстрата возможностью использовать минимальные объемы исследуемого материала
- **стабильность при хранении** всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (до года и более)
- **простота проведения реакции** наличием как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета
- **возможность автоматизации** всех этапов реакции
- **экологическая чистотой и безопасностью для мед. персонала** (в отличии от РИА)
- **относительно низкая стоимость** диагностических наборов

# Сегодня в ИФА лаборатории можно делать следующие исследования:

- **диагностика**
  - ✓ инфекционных заболеваний
  - ✓ аутоиммунных заболеваний
- **определение**
  - ✓ гормонов
  - ✓ онкомаркеров
  - ✓ цитокинов
  - ✓ факторов роста
- **выявление маркеров различных заболеваний**

# Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

## ○ Принцип метода

- искусственный процесс многократного копирования (амплификации) специфической последовательности ДНК, осуществляемый *in vitro* .

Копирование ДНК при ПЦР осуществляется специальным ферментом (ДНК-полимеразой), как и в клетках живых организмов. ДНК-полимераза, двигаясь по одиночной цепи ДНК(матрице), синтезирует комплементарную ей последовательность ДНК.

Для начала синтеза цепи ДНК ДНК-полимеразе необходима РНК-затравка (праймер), к которой она может начать присоединять нуклеотиды.

- ❖ Принцип ПЦР сформулировал Гобинд Корана в 1971
- ❖ В 1983 Кэри Мюллису удалось провести ПЦР
- ❖ В 1993 за изобретение ПЦР Кэри Мюллису вручена Нобелевская премия по химии



# Стадии метода ПЦР

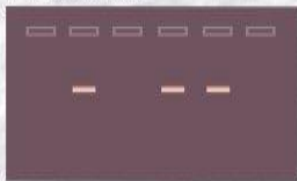
## 1. Выделение ДНК



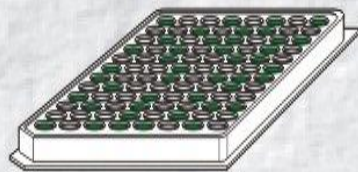
## 2. Амплификация



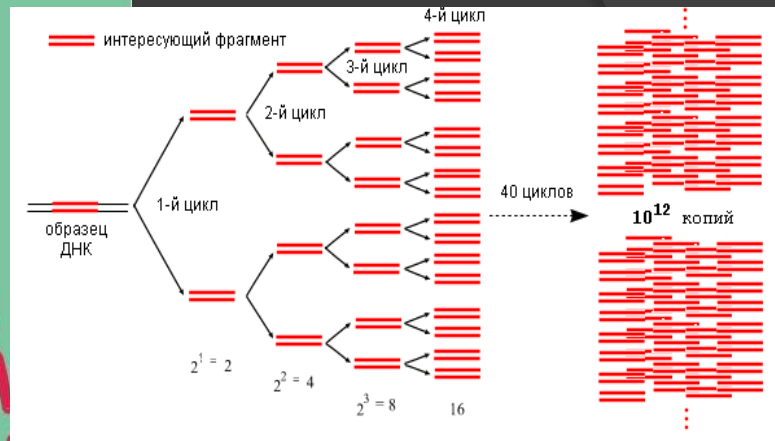
## 3. Детекция



Электрофорез



Гибридизация



КОНТАМИНАЦИЯ

фрагмент ДНК



# Методы анализа продуктов реакции

- **Метод гель-электрофореза** с последующим окрашиванием красителем, специфичным к ДНК, например бромистым этидием, традиционно применяется во многих лабораториях для обнаружения амплифицированной ДНК и определения ее размера
- **Использование гибридизации** с внутренними ДНК-зондами позволяет в ряде случаев значительно повысить чувствительность и специфичность детектирования ПЦР-продуктов
- Применение специальных **флуоресцентных «маркеров»** позволяет контролировать проведение амплификации или детектирование конечных продуктов ПЦР непосредственно в реакционной пробирке.

# Преимущества ПЦР

1. **Универсальность.** Метод принципиально позволяет обнаруживать любые ДНК и РНК даже в тех случаях, когда другими способами это сделать невозможно. Вне зависимости от объекта и области применения ПЦР (клиническая медицина, криминалистика, ветеринария, генетика, молекулярная биология) используется стандартный комплект приборов. Это обуславливает универсальность процедуры постановки ПЦР при исследовании любых биологических объектов.

2. **Специфичность.** Высокая специфичность (100 %) метода обусловлена тем, что в исследуемом материале определяется уникальный фрагмент НК (нуклеотидная последовательность), характерный только для данного возбудителя или гена. Таким образом, ПЦР-диагностикумы дают возможность избежать проблем, связанных с перекрестно-реагирующими антигенами.



# Преимущества ПЦР

3. **Чувствительность.** Возможность проведения не только качественной (наличие), но и количественной (концентрация) оценки содержания НК. В настоящее время реальный порог чувствительности коммерческих амплификационных тест-систем позволяет определять несколько сот копий в исследуемом образце.

4. **Актуальность ответа** (быстрота получения результата). Высокая технологичность и автоматизация метода позволяет получить результаты исследования в руки врача и пациента в день проведения анализа.

5. **Возможность доклинической и ретроспективной диагностики ПЦР** позволяет осуществить определение патогена или дефектного гена в организме ещё до развития заболевания. Например, при инфекциях в инкубационном периоде, т. е. серонегативной фазе или при латентном характере заболевания. Кроме того, возможно проведение ПЦР в архивном(фиксированном) материале или биологических остатках, что важно для идентификации личности или отцовства.

# Преимущества ПЦР

6. Проведение анализа возможно в **минимальном объеме** пробы (до нескольких микролитров), что крайне важно в неонатологии, судебной медицине, клинической генетике и т. п.
7. Возможность **одновременной диагностики** нескольких возбудителей заболеваний или аномальных генов в одной пробе без ущерба для чувствительности или специфичности результата.
8. **Возможность экспертизы**. Полученные результаты ПЦР возможно вносить в компьютерные информационные носители или фотографии для оценки независимыми экспертами.

# Недостатки ПЦР

## 1. Технологический .

Метод ПЦР подразумевает под собой высочайшие требования к оснащению лаборатории, качеству тест-наборов и строжайшее соблюдение регламента исследования во избежание получения ложных результатов. Решение проблемы качества анализов возможно при соответствующей квалификации персонала и обязательной сертификации лаборатории.

## 2. Клинический.

Закрывающийся в неоднозначной прогностической оценке положительного результата ПЦР. Именно этот факт зачастую является необоснованным аргументом практических врачей для сомнения в полученном результате и эффективности метода ПЦР.

**Например.** Показано, что только у 40 % – 60 % лиц с обнаруженной в крови методом ПЦР ДНК цитомегаловируса клинически может развиваться заболевание. В данной ситуации при оценке результатов исследования совершается типичная ошибка, заключающаяся в отождествлении двух принципиально различных понятий – «инфицированность» и «инфекционная болезнь».

# Экспресс-методы диагностики

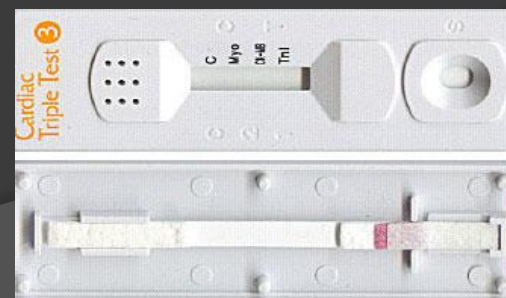
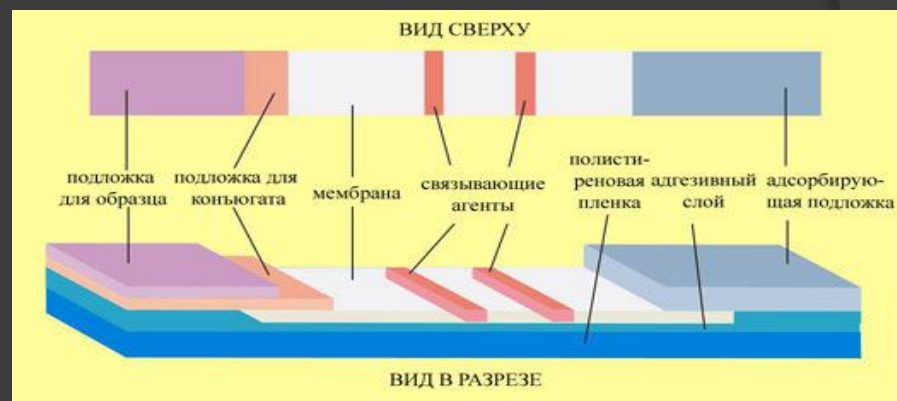
## Иммунохроматографический анализ (ИХА)

Радикальное упрощение аналитических процессов позволяет приблизить диагностику к месту лечения. Опережающий рост объемов производства средств экспресс-диагностики за счет иммунохроматографических методов и создание экспресс-технологий.

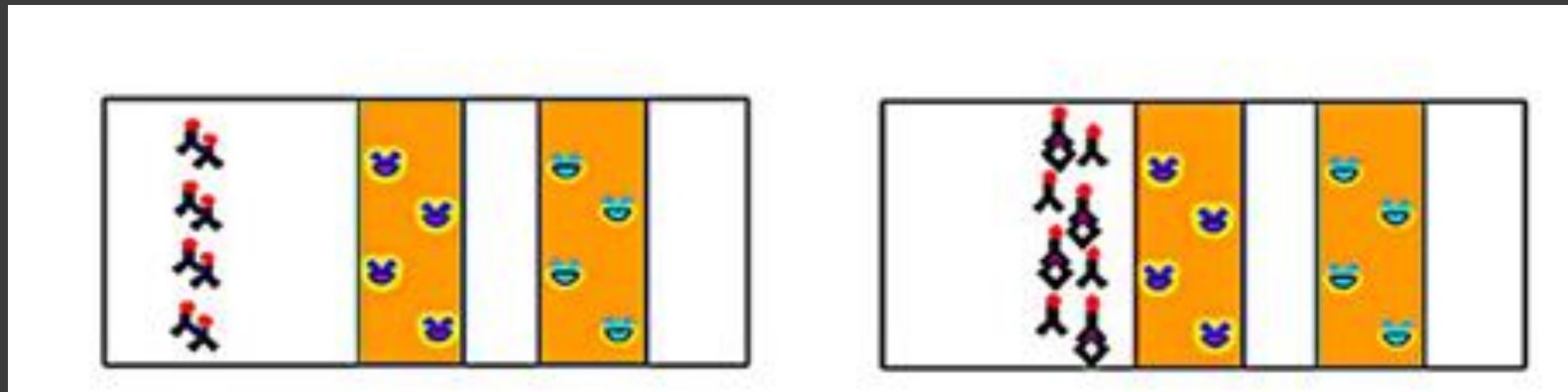
### ПРОИЗВОДСТВО СРЕДСТВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПО СЕГМЕНТАМ

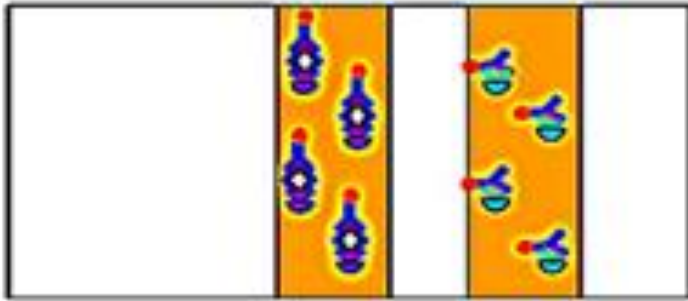
МИРОВОЙ ОБЪЕМ ПРОИЗВОДСТВА, МЛРД.ДОЛЛ.

СЕГМЕНТ	2012	2017	Рост
Экспресс-диагностика	15	22,1	47%
Иммунохимия	14,3	19,9	39%
Клиническая биохимия	7,1	8,8	24%
Молекулярная диагностика	5,9	8,8	49%
Гематология	4,3	5,9	37%
Микробиология	2,6	3,7	42%
Гемостаз	1,8	2,6	44%
Гематологическая иммунология	1,5	1,8	20%
<b>ВСЕГО:</b>	<b>52,5</b>	<b>73,6</b>	<b>40%</b>

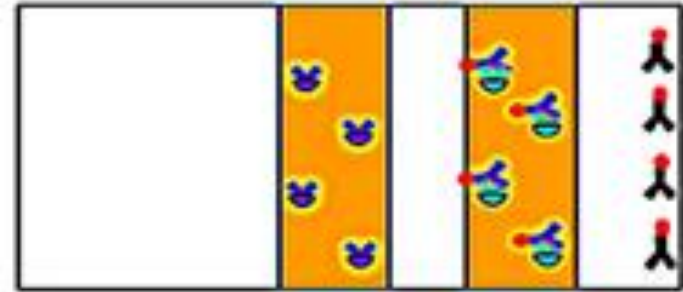


В основе метода лежит технология тонкослойной хроматографии. Биоматериал в объеме 100 мкл (5-6 капель) наносится через специальное приемное окно на подложку для образца. При прохождении через фильтр, под действием капиллярных сил пропитывает полосу, где белки-маркеры вступают в реакцию с моноклональными антителами, мечеными коллоидным золотом, образуя комплексы антиген-антитело. Коллоидное золото – специальный краситель, видимый даже в сверхнизких концентрациях.





**В** – положительный результат анализа. Меченые антитела фиксируются в обеих зонах захвата.



**Г** – отрицательный результат анализа. Меченые антитела фиксируются только в контрольной зоне. Несвязавшиеся антитела мигрируют далее в абсорбционную мембрану.

Далее под действием капиллярных сил эти **комплексы двигаются по хроматографической мембране** и вступают в реакцию с иммобилизованными антителами в соответствующих зонах против тех же белков. При этом, если целевой белок-маркер присутствует в достаточном количестве, окрашенный конъюгат, связанный с белком, накапливается в зоне иммобилизации антител против этого белка. Образуется как бы «сэндвич».

**Свободный конъюгат** продвигается по хроматографической мембране и захватывается в контрольной полосе иммобилизованными вторичными антителами. Если в зонах захвата накопится достаточное количество иммунных комплексов, то полосы благодаря частицам коллоидного золота приобретают характерный бордовый оттенок.

**Контрольная зона окрашивается всегда.**

Если в контрольной зоне не появилось чёткой цветной полосы, то результат теста неправилен, и в этом случае образец должен быть повторно протестирован. При этом необходимо использовать новое тестовое устройство.



# Современные возможности ИХА

## Вирусы

- ✓ Ротавирусы
- ✓ Аденовирусы
- ✓ Астровирусы
- ✓ Энтеровирусы
- ✓ RS вирусы
- ✓ Вирус гриппа
- ✓ Вирус Эпштейн-Барра
- ✓ ВИЧ

## Бактерии

- ✓ Стрептококки гр. А, гр. В
- ✓ Хеликобактер
- ✓ Токсины А и В клостридий
- ✓ Энтерогеморрагические штаммы серогруппы O157 E.coli
- ✓ Сальмонелла
- ✓ Листерия
- ✓ Кампилобактер
- ✓ Гонококк
- ✓ Легионелла
- ✓ Сибирская язва



## Простейшие

- ✓ Криптоспоридии
- ✓ Лямблии
- ✓ Плазмодий
- ✓ Амебиаз



**«Я заклинаю Вас,  
Заботьтесь об этих священных жилищах,  
которые выразительно называют  
лабораториями.**



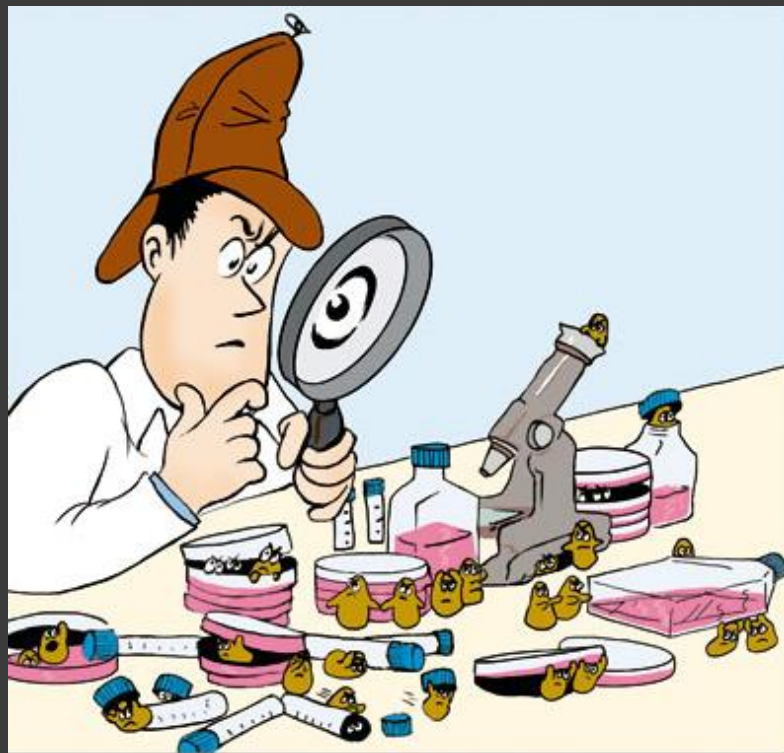
**Требуйте, чтобы число их множилось и  
чтобы их оснащали.**

**Эти храмы будущего богатства и  
благополучия,  
Отсюда человечество взрослеет, набирает  
силы и становится лучше»**



**Луи Пастер**

# Спасибо



# за внимание!