

Роль микробиологической лаборатории в реализации программы СКАТ

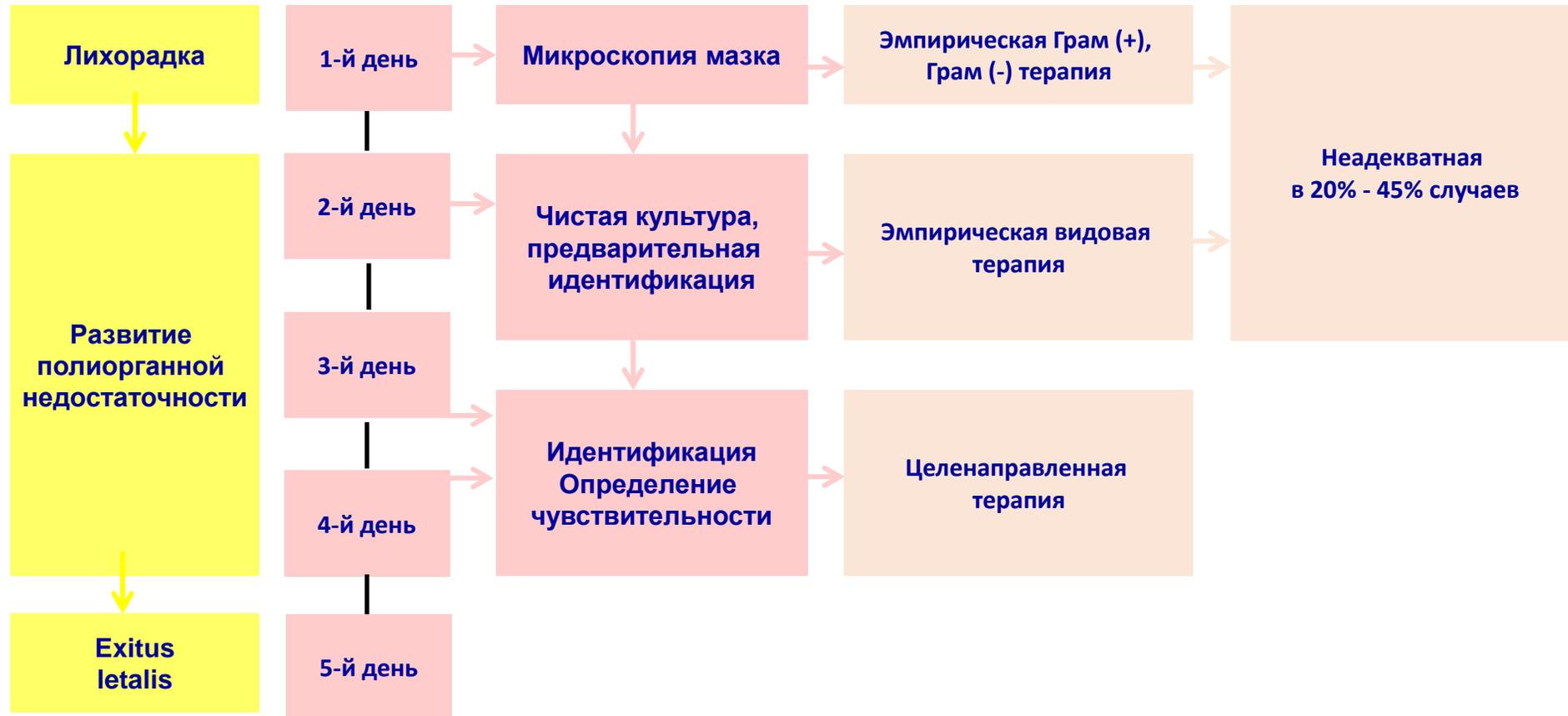
Сергей Сидоренко

Детский научно-клинический центр инфекционных болезней
Кафедра медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова
Санкт-Петербург

Основные направления

- Обоснование этиотропной терапии инфекционных болезней у отдельных пациентов,
- Формирование стратегии и тактики использования антимикробных средств
- Обоснование мероприятий и функционирование системы инфекционного контроля.

Временные рамки развития тяжелых инфекций и сроки получения результатов классического микробиологического исследования



«Идеальная» микробиологическая лаборатория

- 24 часа 7 дней в неделю
- Детекция бактериальных и вирусных патогенов
- Консолидация методов этиологической диагностики
 - Классические культуральные
 - Молекулярные
 - Иммунологические

Молекулярные методы

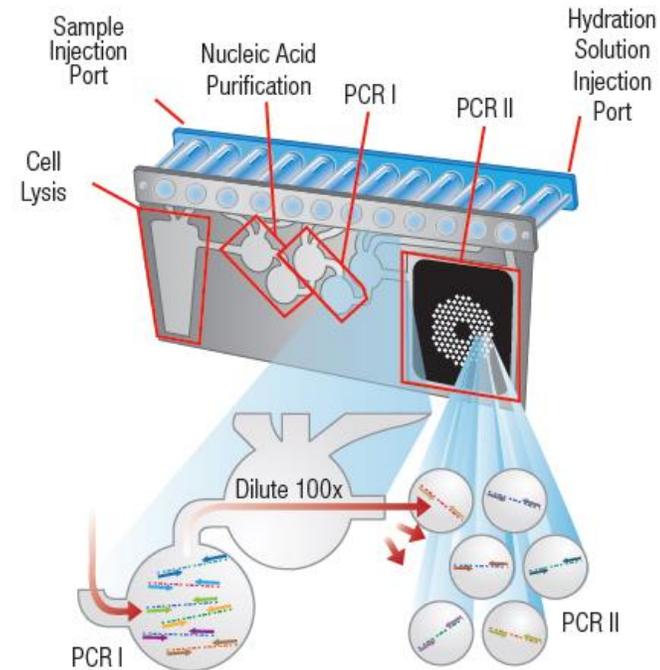
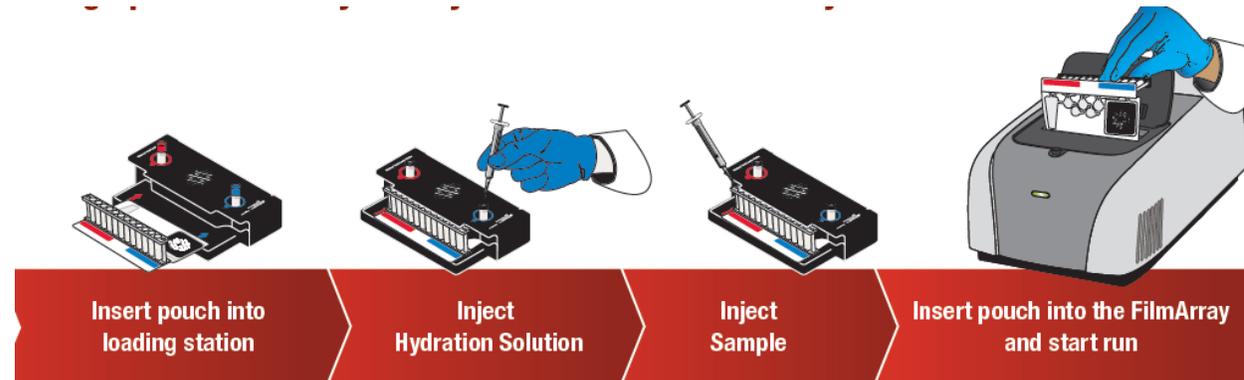
- Наиболее перспективны при исследовании материалов из стерильных локусов
- При исследовании крови не удастся преодолеть технологические проблемы, связанные с присутствием ингибиторов и большого количества эукариотической ДНК

Молекулярные методы детекции возбудителей инфекционных болезней - открытые системы

ПЦР с электрофоретической детекцией и детекцией в реальном времени – требует специальной инфраструктуры

- Выделение НК
- Приготовление реакционных смесей
- Постановка реакции
- Большинство амплификаторов предназначены для работы с плашками

Молекулярные методы детекции возбудителей инфекционных болезней - закрытые системы **FilmArray**



Синдромный подход к диагностике

Гемокультура

Грам-

Acinetobacter baumannii
Haemophilus influenzae
Neisseria meningitidis
Pseudomonas aeruginosa
Enterobacter cloacae complex
Escherichia coli
Klebsiella oxytoca
Klebsiella pneumoniae
Proteus
Serratia marcescens
Enterococcus
Listeria monocytogenes

Грам+

Staphylococcus aureus
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pyogenes
Грибы
Candida albicans
Candida glabrata
Candida krusei
Candida parapsilosis
Candida tropicalis

Гены резистентности

mecA – methicillin resistant
vanA/B – vancomycin resistant
KPC – carbapenem resistant

Менингиты

Escherichia coli K1
Haemophilus influenzae
Listeria monocytogenes
Neisseria meningitidis
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae
Cytomegalovirus (CMV)
Enterovirus
Herpes simplex virus 1 (HSV-1)
Herpes simplex virus 2 (HSV-2)
Herpes simplex virus 3 (HSV-3)
Human parechovirus
Varicella zoster virus (VZV)
Cryptococcus neoformans/gattii

Респираторные

Bordetella pertussis
Chlamydia pneumoniae
Mycoplasma pneumoniae
Adenovirus
Coronavirus HKU1
Coronavirus NL63
Coronavirus 229E
Coronavirus OC43
Human Metapneumovirus
Human Rhinovirus/Enterovirus
Influenza A
Influenza A/H1
Influenza A/H1-2009
Influenza A/H3 Influenza B
Parainfluenza 1
Parainfluenza 2
Parainfluenza 3
Parainfluenza 4
Respiratory Syncytial Virus

Гастроэнтериты

Campylobacter
Clostridium difficile (Toxin A/B)
Plesiomonas shigelloides
Salmonella
Yersinia enterocolitica
E. coli O157
Enteroaggregative E. coli
Enteropathogenic E. coli
Enterotoxigenic E. coli (ETEC)
Shiga-like toxin-producing E. coli
Shigella/Enteroinvasive E. coli
Adenovirus F 40/41
Astrovirus
Norovirus GI/GII
Rotavirus A
Sapovirus (I,II, IV, and V)
Cryptosporidium
Cyclospora cayetanensis
Entamoeba histolytica
Giardia lamblia

Анализ химического состава бактерий в диагностике

Основные компоненты

- Нуклеиновые кислоты
- Белки
- Полисахариды
- Липиды
- Др.

Методы анализа

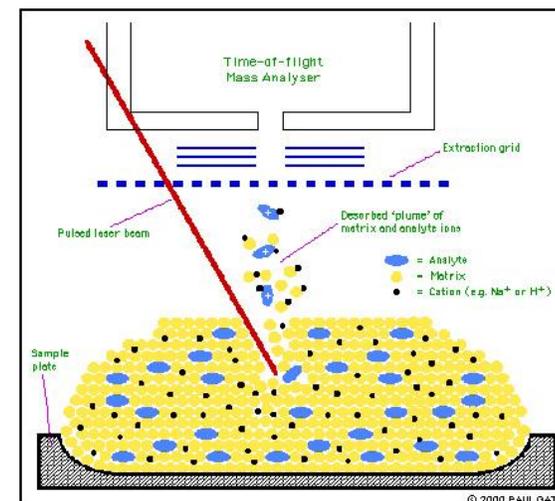
- Определение нуклеотидной и аминокислотной последовательности
- Иммунологические
- Физико-химические
 - Хроматография
 - Масс-спектрометрия
 - Анализ собственной флюоресценции
 - Спектральный анализ

Основные направления использования современных технологий

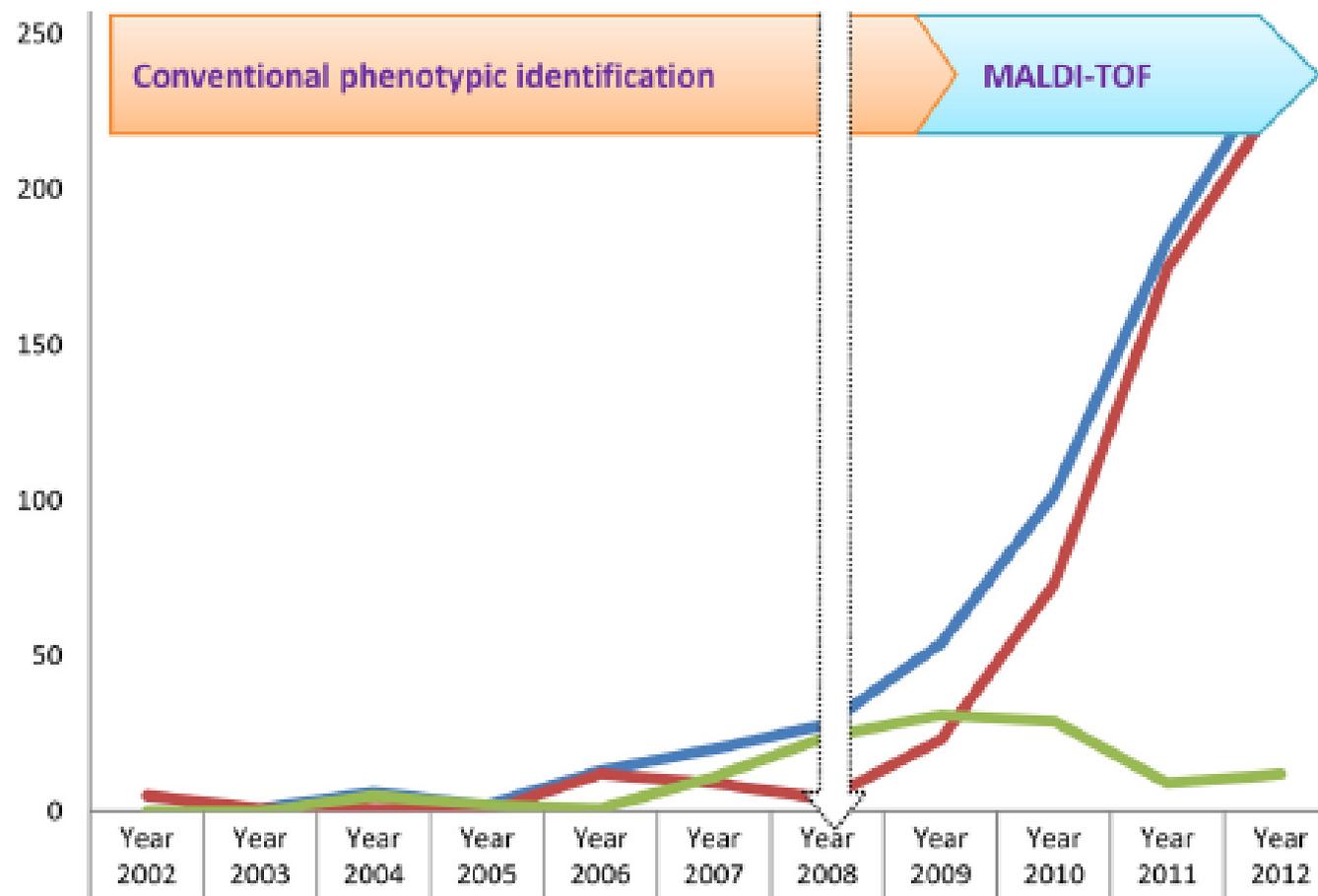
- Идентификация чистых культур бактерий
- Детекция бактерий в биологическом материале без предварительной обработки
- Детекция бактерий в биологическом материале после подращивания

MALDI-TOF масс-спектрометрия

- **Масс-спектрометрия** – аналитический метод измерения массы молекул или атомов, входящих в состав анализируемого вещества
- Масс-спектрометрия биомолекул стала возможной после разработки методов **«мягкой»** ионизации в матрице под воздействием лазера
 - **MALDI** - **M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption\Ionization (Матрично-ассоциированная лазерная десорбция/ионизация)
 - **TOF** – **T**ime **o**f **F**light (Время пролета)



Выделение редких видов



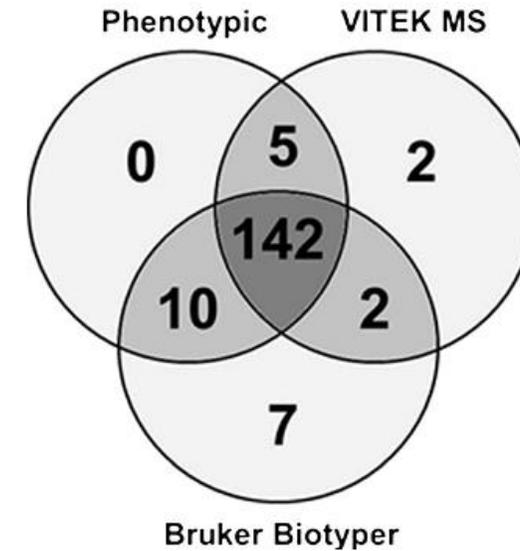
Идентификация проблемных патогенов

Грам +

Staphylococcus aureus 2
Enterococcus avium 1
Enterococcus faecalis 1
Gemella haemolysans 1
Granulicatella adiacens 1
Kytococcus sp. 1
Staphylococcus intermedius 1
Staphylococcus pasteurii 1
Staphylococcus pettenkoferi 1
Streptococcus constellatus 1
Streptococcus porcinus 1
Streptococcus salivarius
Actinomyces sp. 1
Bacillus sp., not Bacillus anthracis 1
Brevibacillus agri 1
Corynebacterium striatum 3
Corynebacterium tuberulostearicum 1
Corynebacterium xerosis 1
Dermabacter hominis 1
Gordonia terrae 1
Lactobacillus casei 1
Lactobacillus salivarius 1
Lactobacillus sp. 1
Microbacterium sp. 2
Paenibacillus sp. 1
Turicella otitidis 1

Грам -

Achromobacter sp.
Alcaligenes faecalis 1
Brevundimonas diminuta 1
Burkholderia cepacia complex 7
Burkholderia gladioli 2
Burkholderia sp., not Burkholderia cepacia 1
Chryseobacterium sp. 2
Cupriavidus pauculus 1
Delftia acidovorans 2
Elizabethkingia meningoseptica 1
Inquilinus sp. 1
Kerstersia gyiorum 1
Leptotrichia buccalis 1
Ochrobactrum anthropi 1
Pandoraea apista 6
Pandoraea pulmonicola 1
Pseudoxanthomonas sp. 1
Psychrobacter sp. 1
Ralstonia sp./Cupriavidus sp. 1
Roseomonas mucosa 1
Stenotrophomonas maltophilia 7
Aggregatibacter actinomycetemcomitans 1
Capnocytophaga gingivalis 1
Cardiobacterium hominis 1
Haemophilus parainfluenzae 1
Haemophilus influenzae 3
Moraxella nonliquefaciens 3
Neisseria flavescens 1
Neisseria meningitidis 2
Pasteurella sp. 1



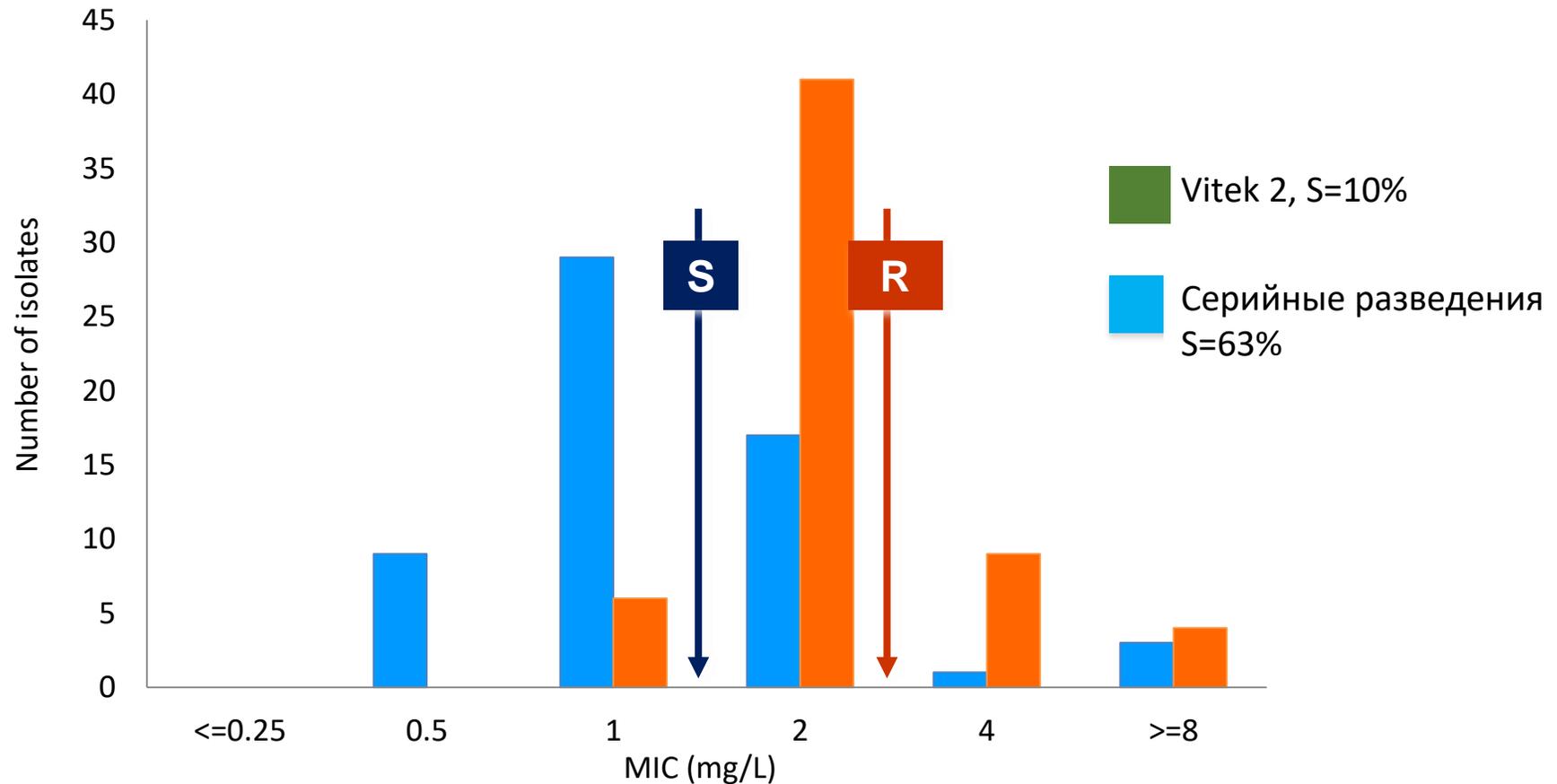
E. McElvania TeKippe, C.A. D. Burnham. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2014)

Распространение методов оценки чувствительности

Опрос 192 стационаров Европы

- 89% - диско-диффузионный метод
- 43% - полуавтоматические методы
 - 43.9% - Vitek
 - 36.6% - ATB
 - 9.8% - Walkaway
 - 2.4% - Autoscan
- 70% - определение МПК
 - 88.1% - Е-тест
 - 11.9% - панели лабораторного изготовления

Тигециклин и КРС + *K. pneumoniae*



These data were obtained in the FIBIM Lab – Department of Medical Biotechnologies, University of Siena, as part of the isolates for the 2011 Italian countrywide survey (Giani, et al. Eurosurveillance 2013)

Моделирование фармакодинамики цефепима методом Монте Карло

T>MIC при 1г каждые 12 ч

<u>MIC</u>	<u>40%</u>	<u>50%</u>	<u>60%</u>	<u>70%</u>
0.5	100	100	100	99.8
1	100	100	99.8	97.5
2	100	100	96.1	82.6
<u>4</u>	99.4	91.3	66.5	34.6
8	77.1	35.9	9.8	1.8
16	5.8	0.6	0	0
32	0	0	0	0

Моделирование фармакодинамики цефепима методом Монте Карло

T>MIC при 2 г каждые 12 ч

<u>MIC</u>	<u>40%</u>	<u>50%</u>	<u>60%</u>	<u>70%</u>
0.5	100	100	100	100
1	100	100	100	100
2	100	100	100	91.4
4	100	99.5	95.9	81.6
<u>8</u>	99.4	90.6	65.6	33.8
16	76.6	35.5	9.7	2.1
32	6.4	0.7	0.1	0

Моделирование фармакодинамики цефепима методом Монте Карло

T>MIC при 2 г каждые 8 ч

<u>MIC</u>	<u>40%</u>	<u>50%</u>	<u>60%</u>	<u>70%</u>
0.5	100	100	100	100
1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
4	100	100	100	100
8	100	100	99.4	95.3
<u>16</u>	100	94.4	76.6	20.1
32	58	23.1	6.4	1.6

Antimicrobial susceptibility tests on groups of organisms or agents for which there are no EUCAST breakpoints

- Использование только метода серийных разведений
- Использование фармакодинамических (PK/PD) критериев
 - Ответ: При лечении возможно будет эффективен препарат А
- При отсутствии (PK/PD) критериев
 - Дикий или не дикий тип (по характеру распределения МПК)
 - Сравнить с родственными бактериями

Методы оценки антибиотикочувствительности

Перспективные

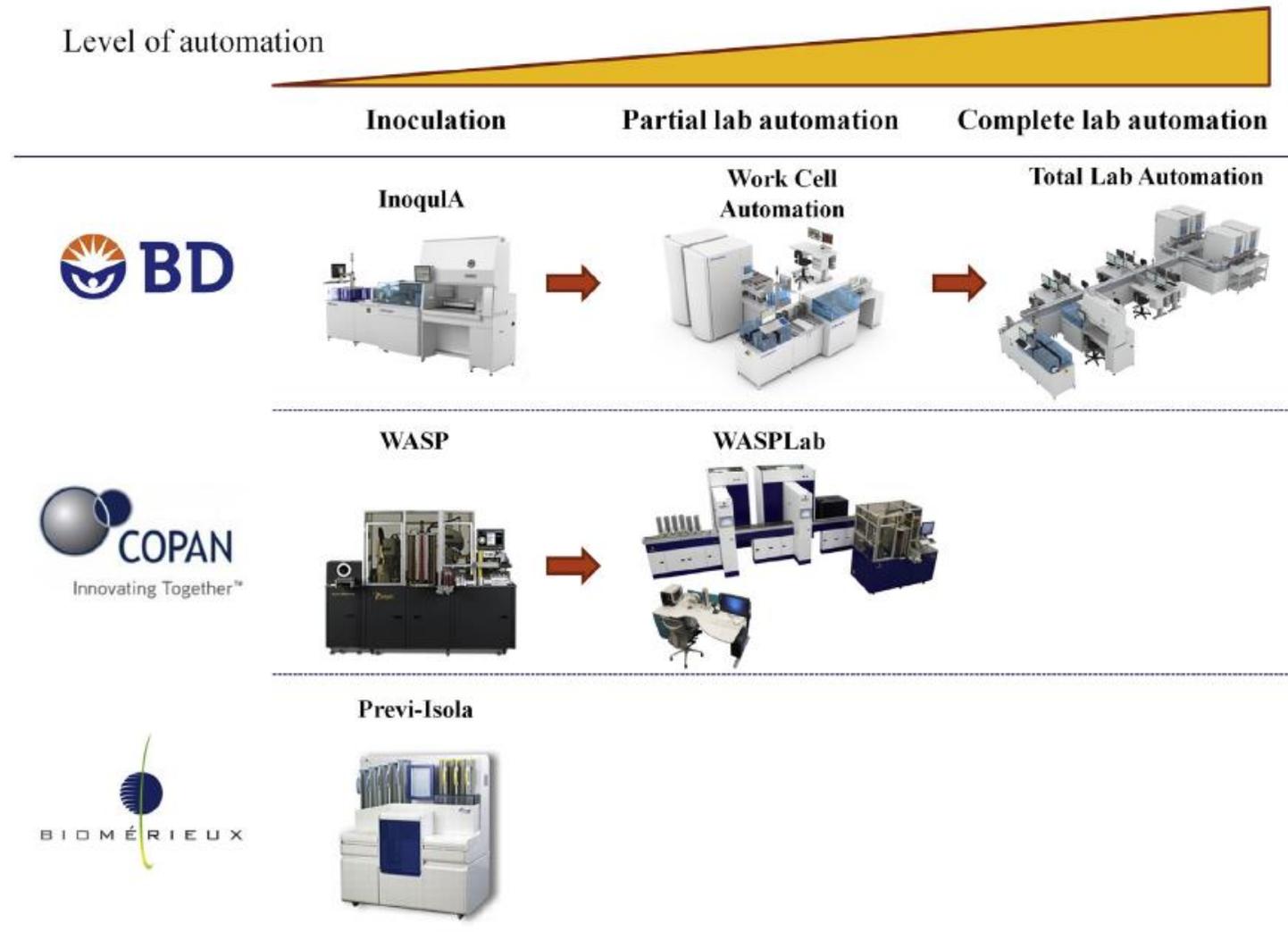
- Калориметрия – динамическая детекция теплопродукции
- MALDI-TOF MS – детекция продуктов деградации антибиотиков и пролиферации бактерий
- Микрокапли – мониторинг роста бактерий или утилизации субстратов в микрообъемах
- Магнитные частицы – изменение спина частиц в магнитном поле в зависимости от количества прикрепившихся бактерий
- Секвенирование новых поколений
- Флюоресцентное окрашивание (живые/мертвые) < 1 ч
- Микроскопия в реальном времени < 1 ч

Методы оценки антибиотикочувствительности

Отдаленные перспективы

- Детекция маркеров апоптоза
- Колориметрическая детекция клеточного дыхания
- Детекция летучих органических соединений
- Измерение импеданса для дифференцировки живых и мертвых бактерий
- Инфракрасная спектроскопия
- Метаболомика – детекция изменений внутриклеточного состава низкомолекулярных соединений
- Ультразвук – различия в вибрации живых и мертвых бактерий
- Рамановская спектроскопия
- Секвенирование РНК

Автоматизация в микробиологии



Развитие идеологии микробиологической диагностики

Традиционная

- Искать наиболее вероятный патоген исходя из клинической картины

Возможная

- Hypothesis-free testing – секвенирование всех нуклеиновых кислот, содержащихся в клиническом образце

Развитие технологий секвенирования



Секвенатор MinION
Oxford Nanopore



Секвенатор PacBio RS II
Pacific Bioscience

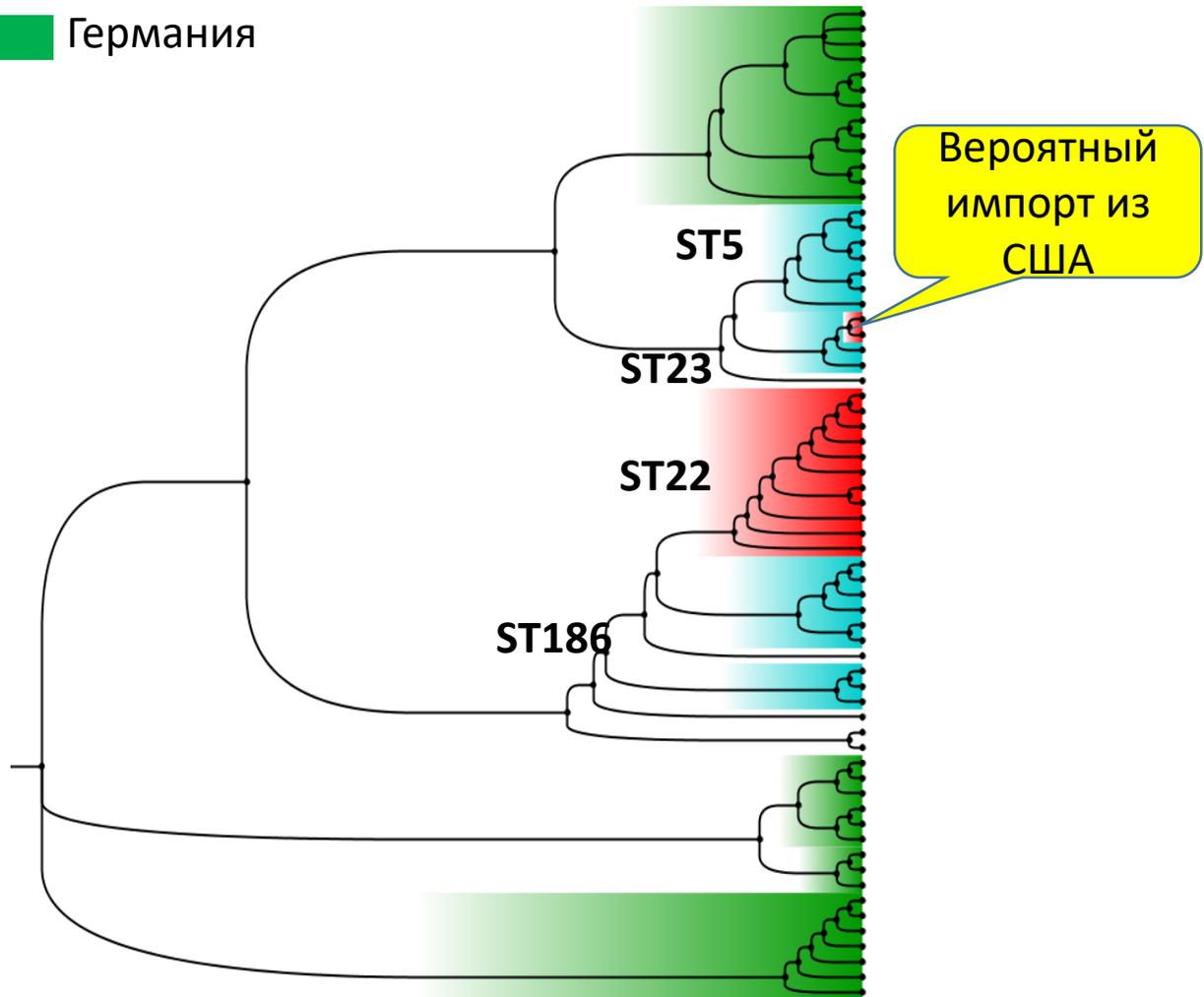
Полногеномное секвенирование для типирования бактерий

- Молекулярные методы типирования (ПЦР, PFGE, сиквенс, MLST, MALDI-typing, etc)
- **2005** – появление технологий Next-Generation Sequencing
 - Draft genome, весь геном представлен совокупностью фрагментов (контиги, скаффолды)
- **2010** – наше время: массовое внедрение WGS
 - Максимальная разрешающая способность
 - Снижение стоимости сиквенса
 - 2005г – 1.000\$ за 1Mb
 - 2010г – 1\$ за 1Mb
 - Появление автоматизации и «user – friendly workflow»
 - Появление доступных биоинформатических сервисов
 - NCBI Genome: 1.000 – 9.000 депонированных сиквенсов для клинически актуальных бактерий (Kpn, Eco, Sa, Spn, Pae, Acb)
 - Стандартизация → внедрение в клиническую диагностику

Геномное выравнивание глобальных изолятов

- Москва
- США
- Германия

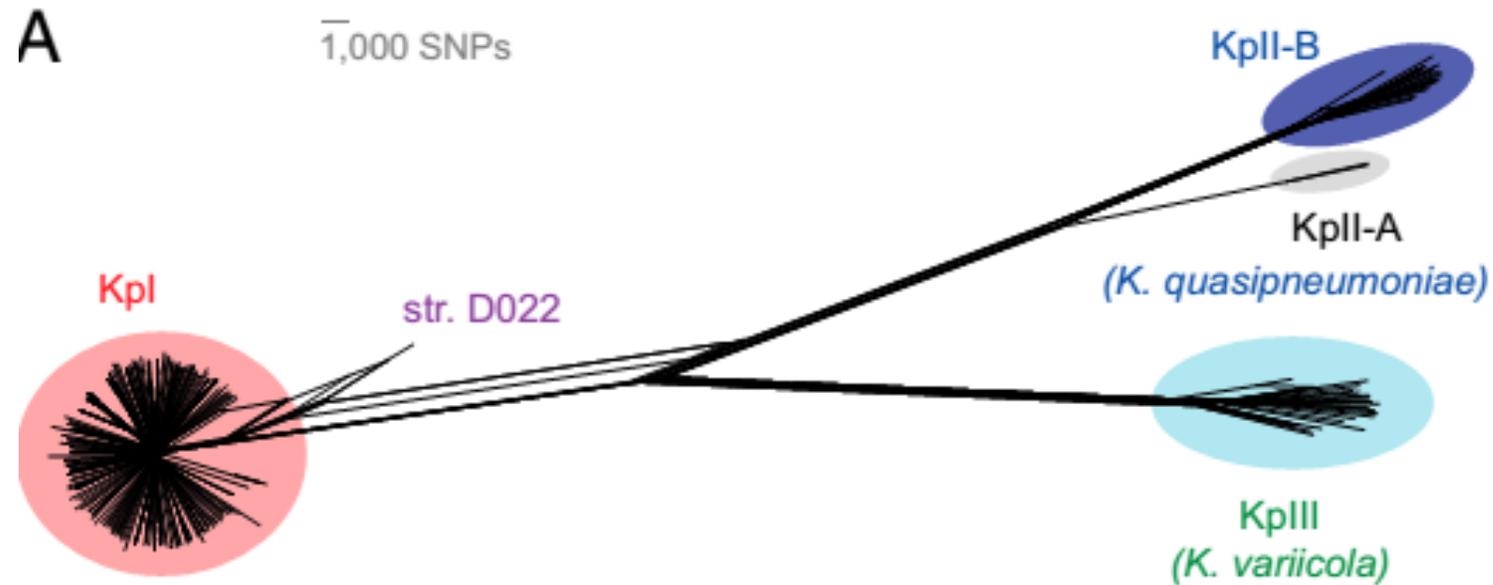
S. epidermidis



S. hominis



Структура популяции *Klebsiella pneumoniae*



Место, выделенных в Санкт-Петербурге, NDM-пол. *K. pneumoniae* в глобальной популяции – SNP-анализ

