

# Роль микробиологической лаборатории в реализации программы СКАТ

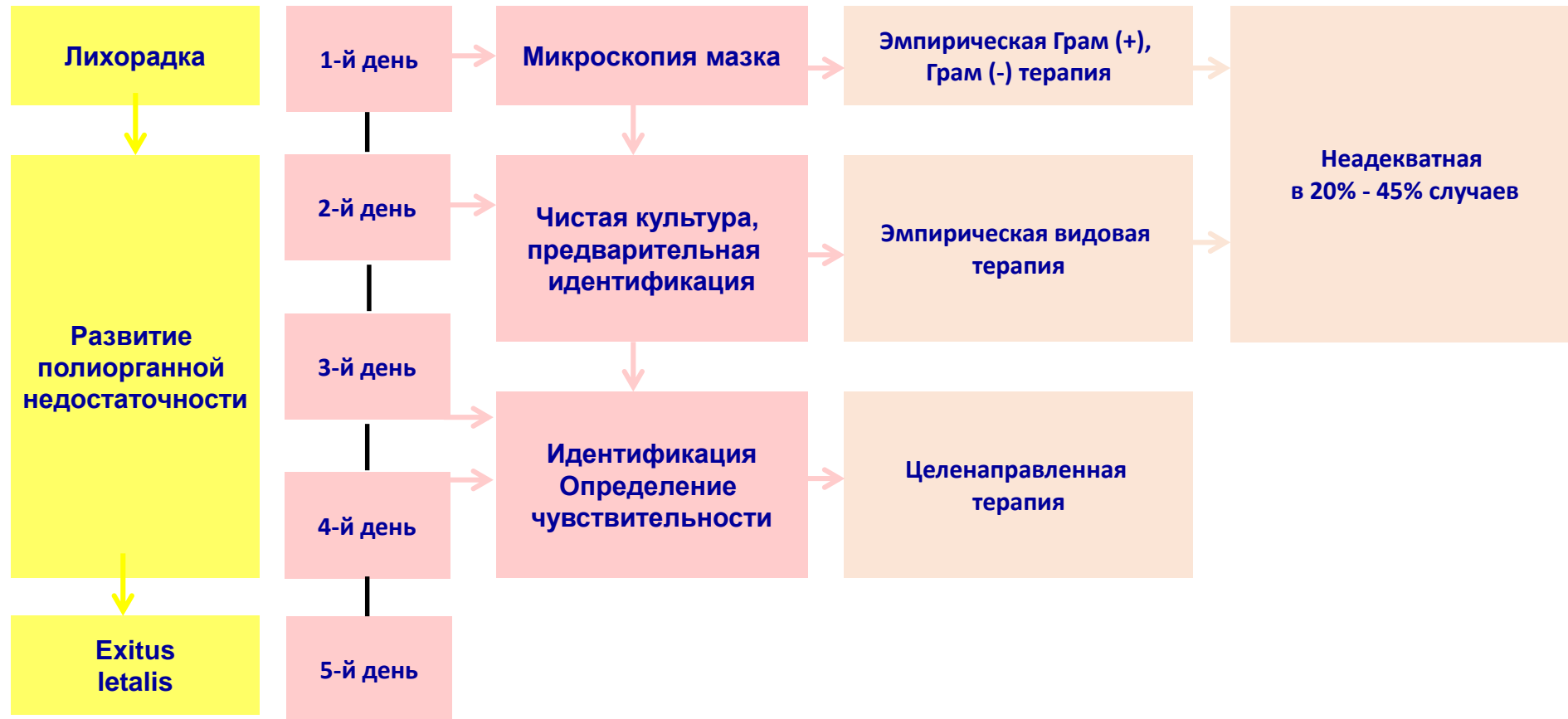
**Сергей Сидоренко**

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 antimicrobных 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

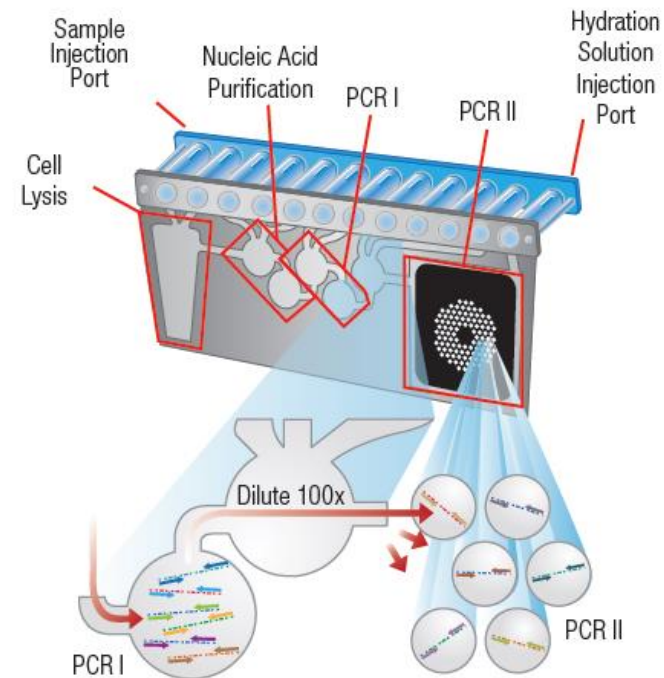
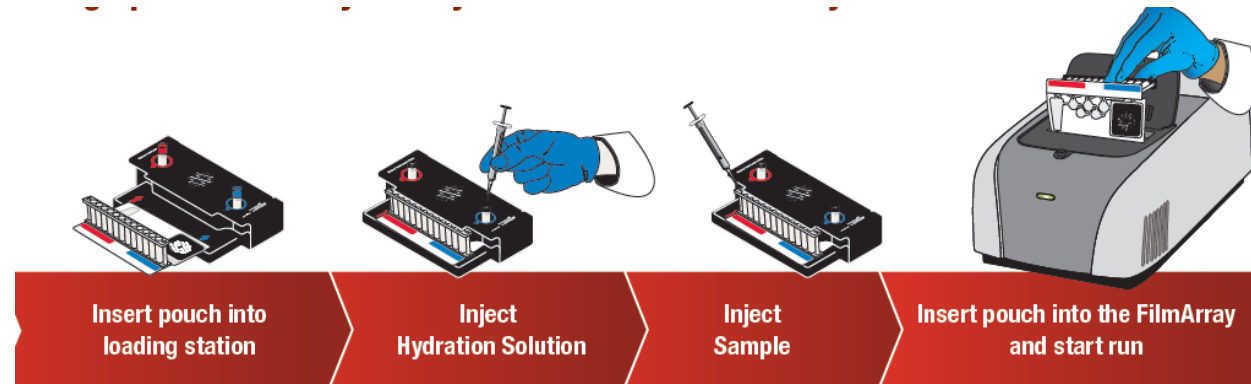
- Наиболее перспективны при исследовании материалов из стерильных локусов
- При исследовании крови не удастся преодолеть технологические проблемы, связанные с присутствием ингибиторов и большого количества эукариотической ДНК

## 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 cayentanensis  
Entamoeba histolytica  
Giardia lamblia



# Анализ химического состава бактерий в диагностике

## Основные компоненты

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

## Методы анализа

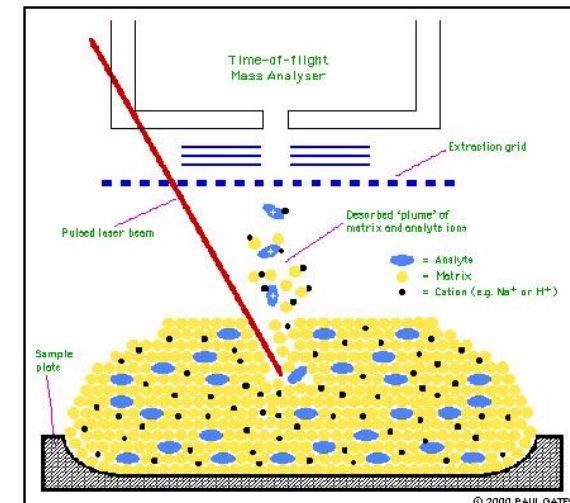
- Определение нуклеотидной и аминокислотной последовательности
- Иммунологические
- Физико-химические
  - Хроматография
  - Масс-спектрометрия
  - Анализ собственной флюоресценции
  - Спектральный анализ

## Основные направления использования современных технологий

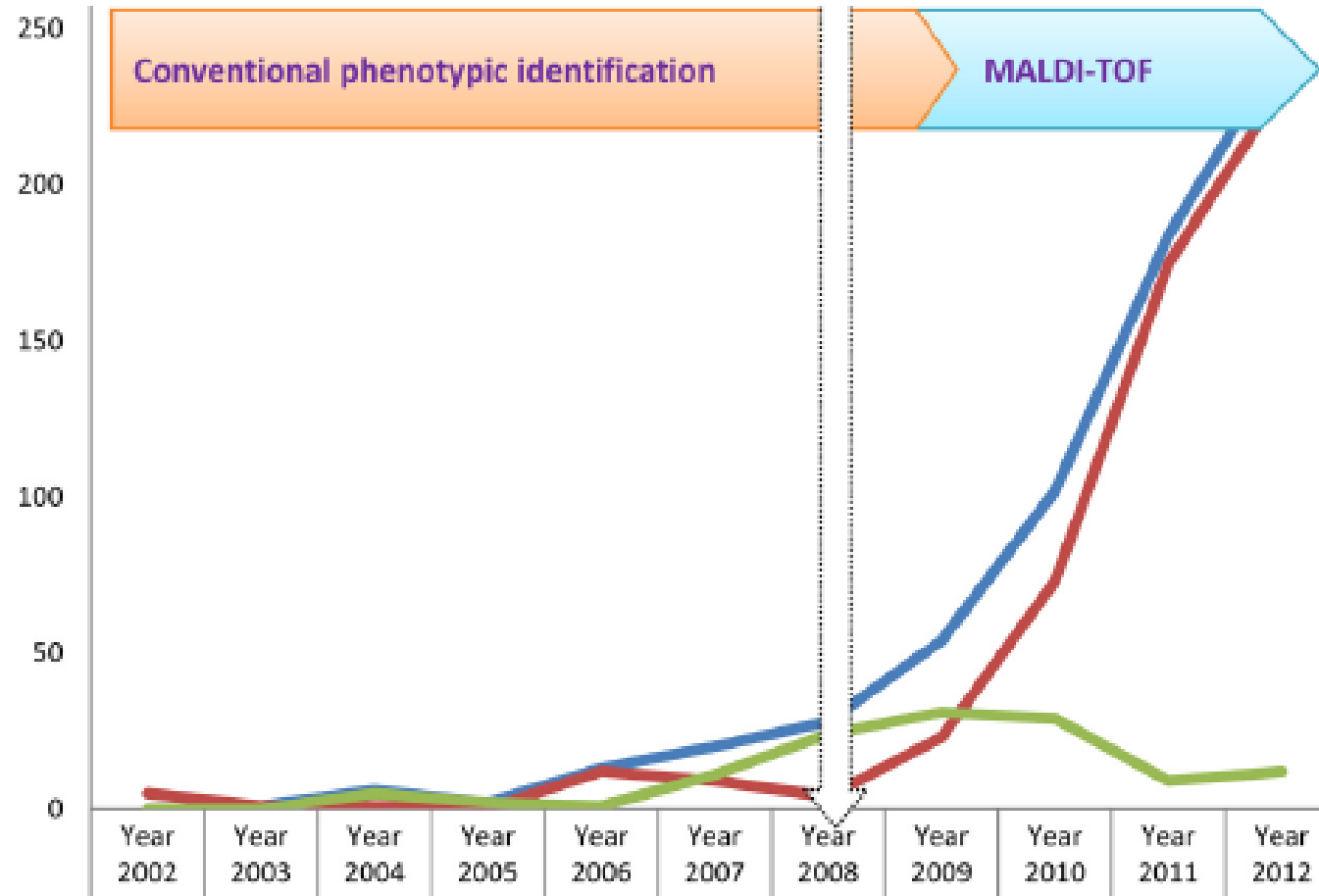
- Идентификация чистых культур бактерий
- Детекция бактерий в биологическом материале без предварительной обработки
- Детекция бактерий в биологическом материале после подращивания

# 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\|**I**onization (Матрично-ассоциированная лазерная десорбция/ионизация)
  - **TOF** – **T**ime **o**f **F**light (Время пролета)



# Выделение редких видов



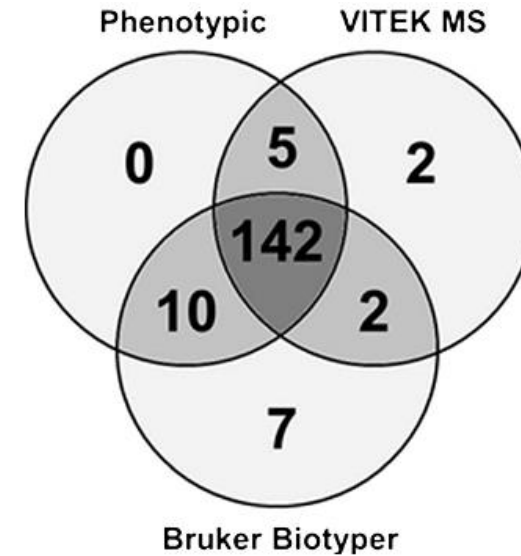
# Идентификация проблемных патогенов

## 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



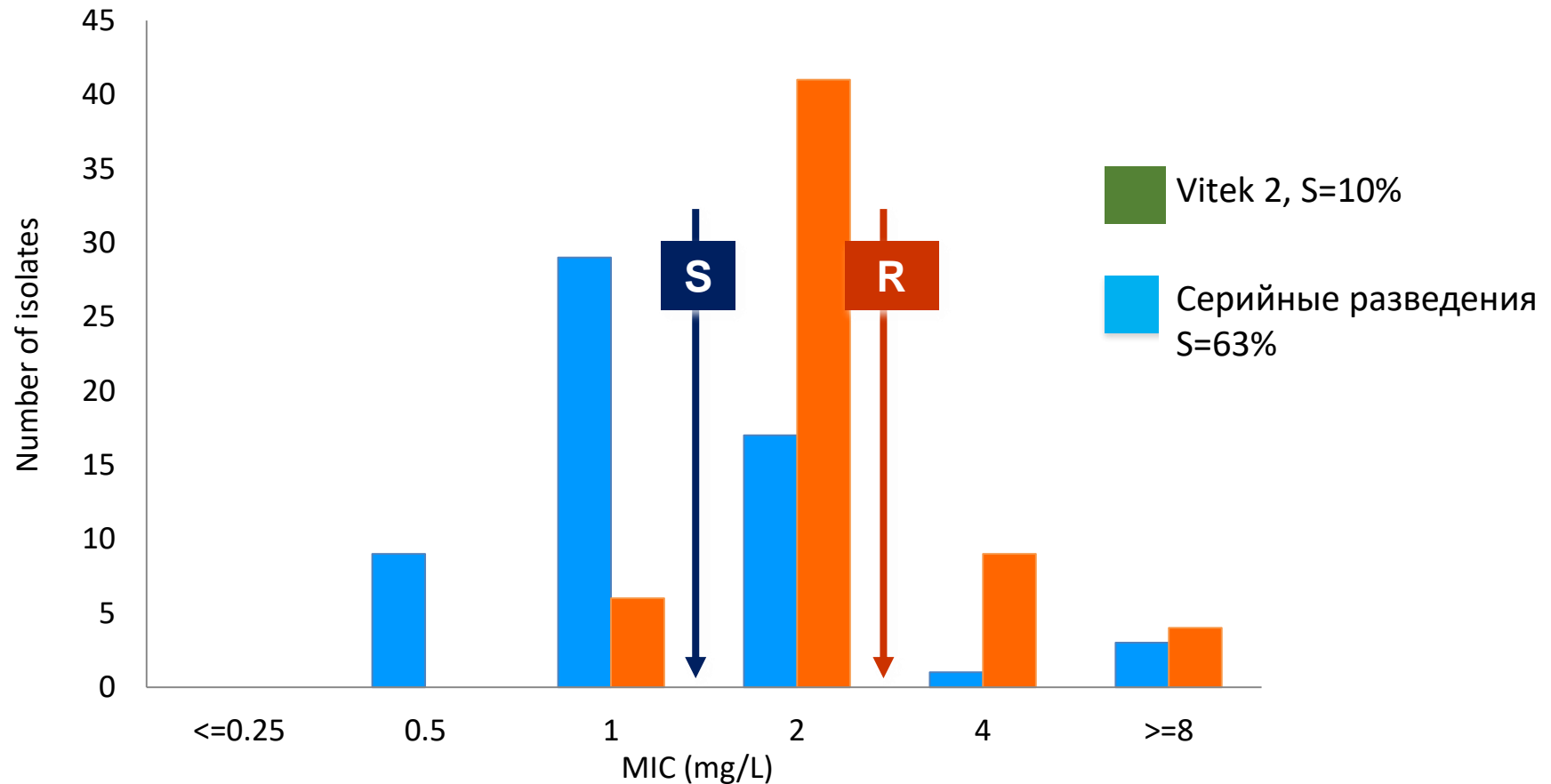
E. McElvania TeKippe, C.A. D. Burnham. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2014)

# 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

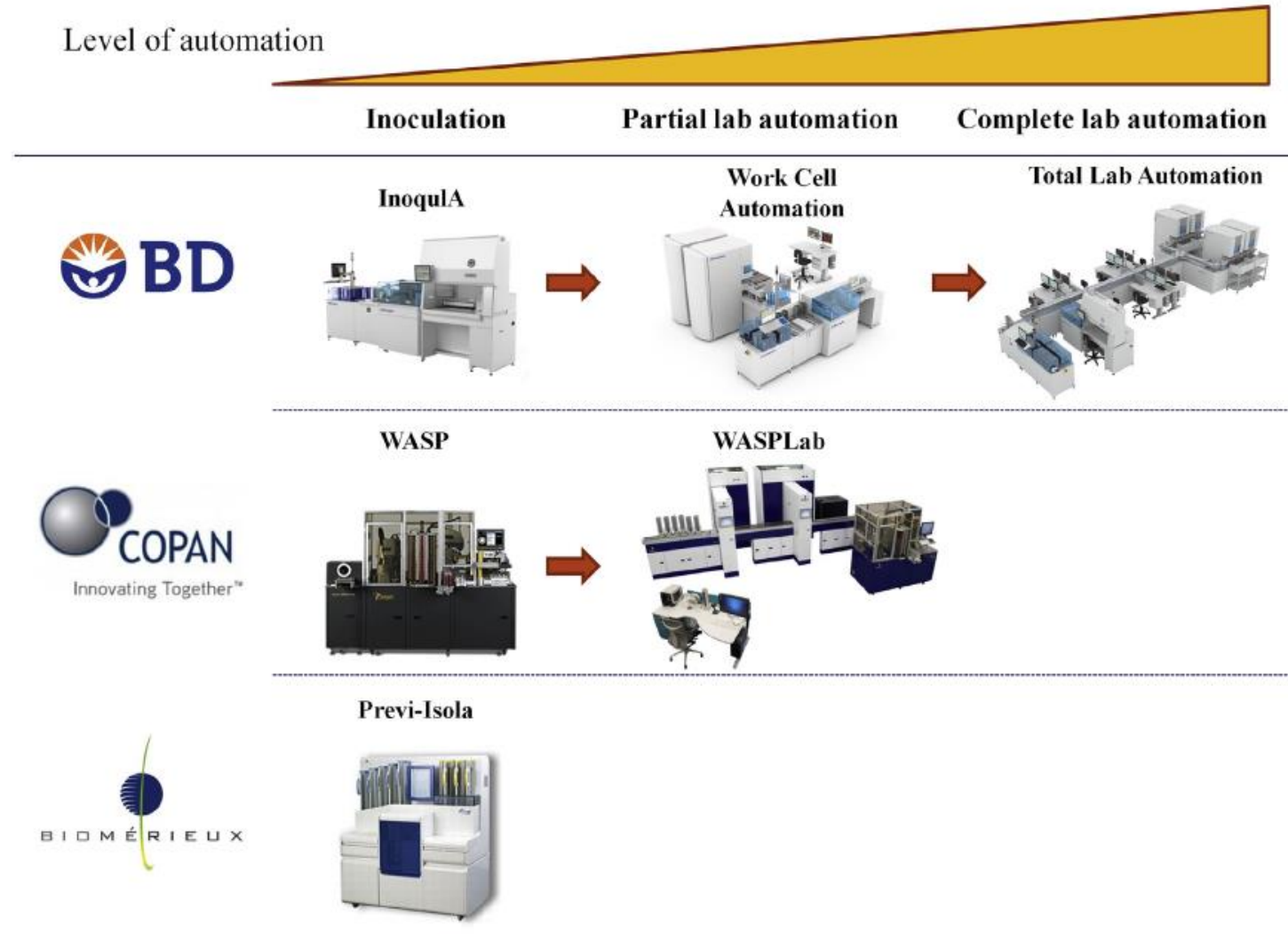
- Калориметрия – динамическая детекция теплопродукции
- MALDI-TOF MS – детекция продуктов деградации антибиотиков и пролиферации бактерий
- Микрокапли – мониторинг роста бактерий или утилизации субстратов в микрообъемах
- Магнитные частицы – изменение спина частиц в магнитном поле в зависимости от количества 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



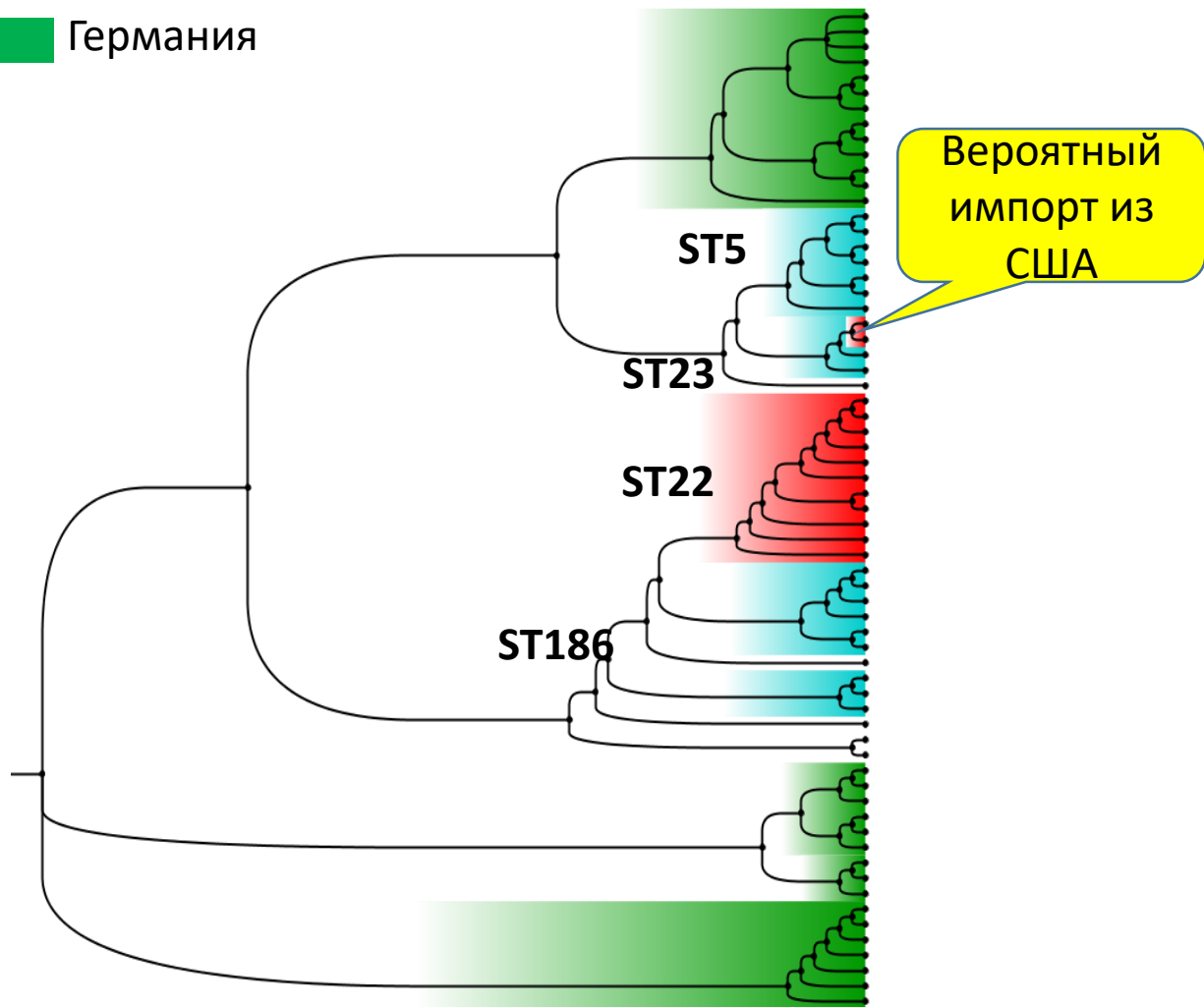
# Полногеномное секвенирование для типирования бактерий

- 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

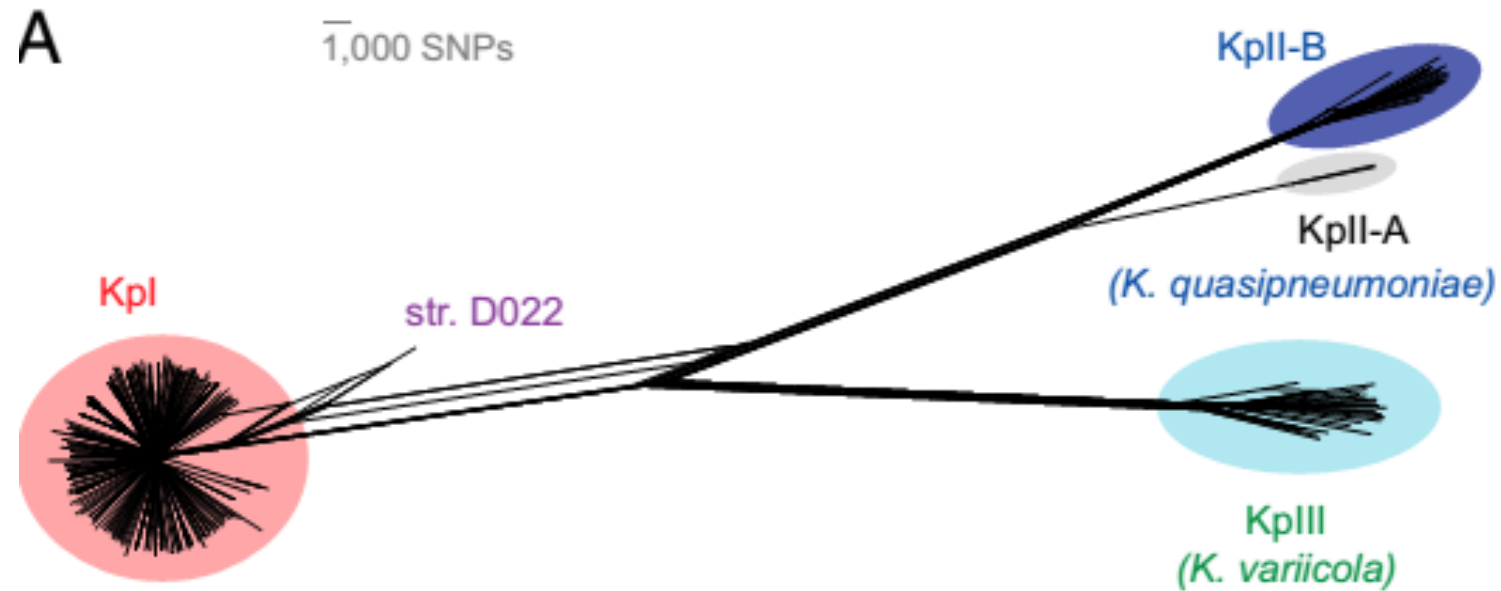
*S. epidermidis*



*S. hominis*



# Структура популяции *Klebsiella pneumoniae*



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

