



АКАДЕМИЯ
ПОСТДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБУ ФНКЦ ФМБА РОССИИ

Кафедра клинической лабораторной диагностики и патологической анатомии с курсом лабораторной микробиологии



Основы клинической микробиологии. Методы и перспективы развития.

доктор медицинских наук, профессор Миронов
Андрей Юрьевич

Задачи клинической микробиологии

Клиническая микробиология как раздел медицинской микробиологии призвана решать две основные задачи:

- этиологическая диагностика инфекционного процесса;
- выбор рациональных средств этиотропной терапии.

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И МЕДИЦИНСКОЙ
ПРОМЫШЛЕННОСТИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ПРИКАЗ № 8
от 19 января 1995 г.**

**О РАЗВИТИИ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЛАБОРАТОРИЙ
КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ (БАКТЕРИОЛОГИИ) ЛЕЧЕБНО-
ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ**

Приказ № 8 устанавливает:

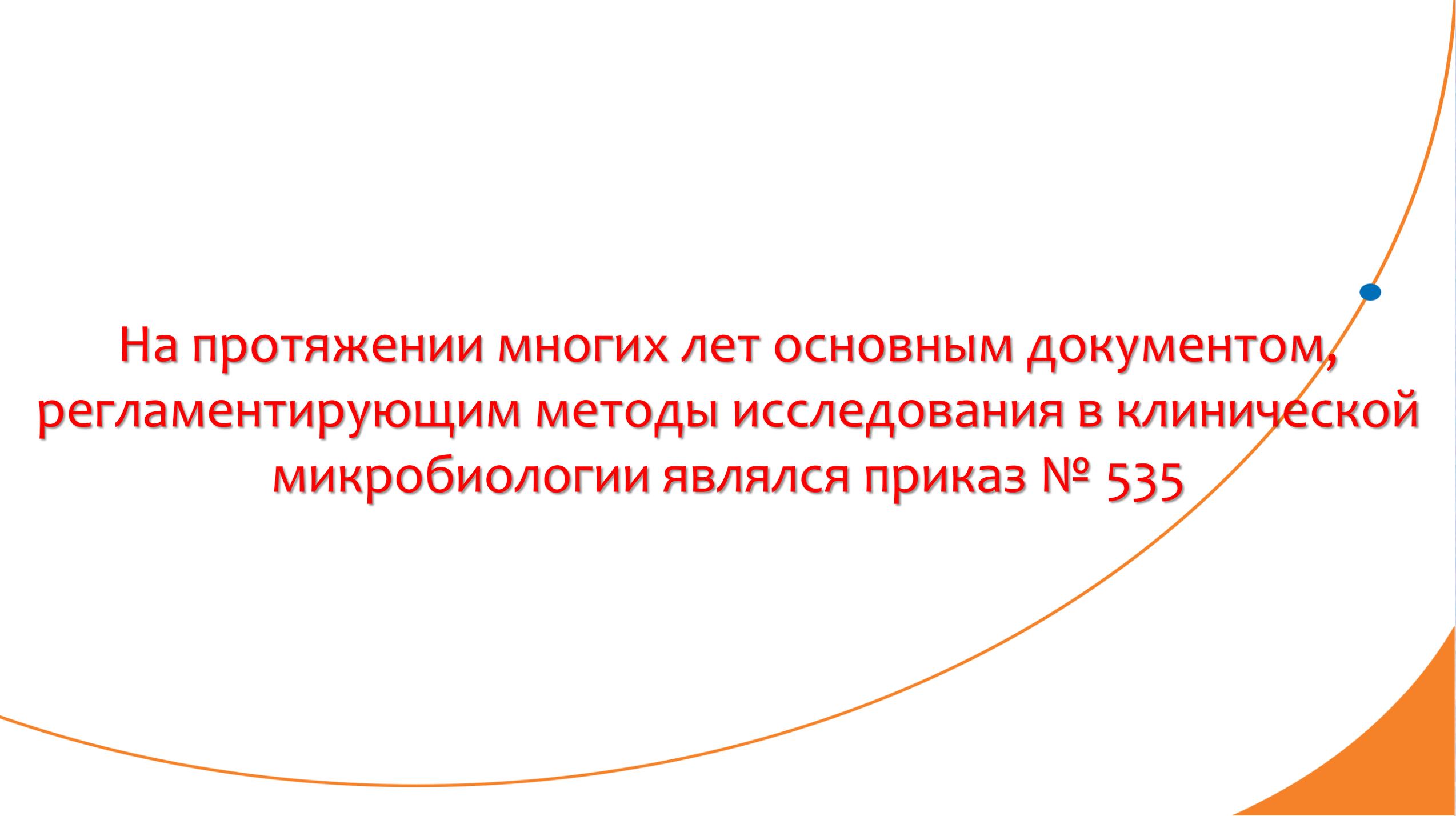
1. Положение о централизованной лаборатории клинической микробиологии (бактериологии), лаборатории клинической микробиологии (бактериологии), отделе клинической микробиологии (бактериологии) клинико-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений (Приложение 1).

Приказ № 8 устанавливает:

2. Положение о заведующем лаборатории клинической микробиологии (бактериологии) (Приложение 2).
3. Положение о враче-бактериологе лаборатории клинической микробиологии (бактериологии) (Приложение 3).
5. Положение о фельдшере-лаборанте лаборатории клинической микробиологии (бактериологии) (Приложение 5).
6. Положение о лаборанте лаборатории клинической микробиологии (бактериологии) (Приложение 6).

Приказ № 8 устанавливает:

7. Квалификационные требования к фельдшеру -лаборанту, лаборанту лаборатории (отдела) клинической микробиологии (бактериологии) (Приложение 7).
8. Расчётные нормы времени на проведение микробиологических (бактериологических) исследований в лабораториях клинической микробиологии (бактериологии) (Приложение 8).
9. Рекомендуемый перечень микробиологических исследований для лабораторий клинической микробиологии (бактериологии) (Приложение 9).
10. Примерный перечень приборов, оборудования и медицинского инструментария для проведения микробиологических (бактериологических) исследований (Приложение 10).



На протяжении многих лет основным документом, регламентирующим методы исследования в клинической микробиологии являлся приказ № 535

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

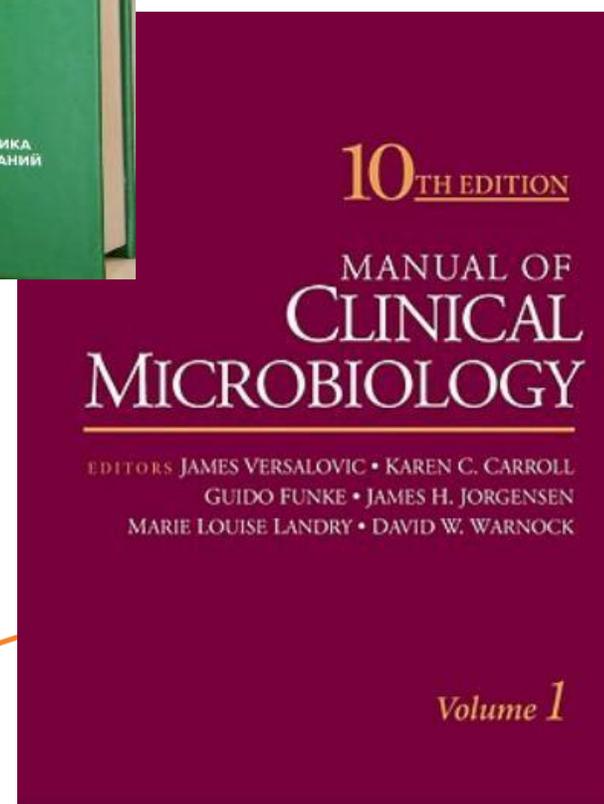
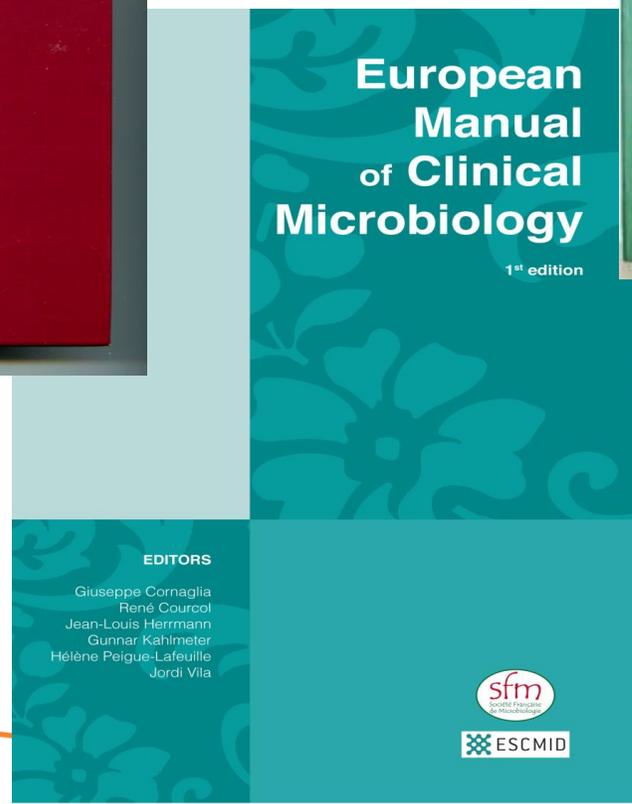
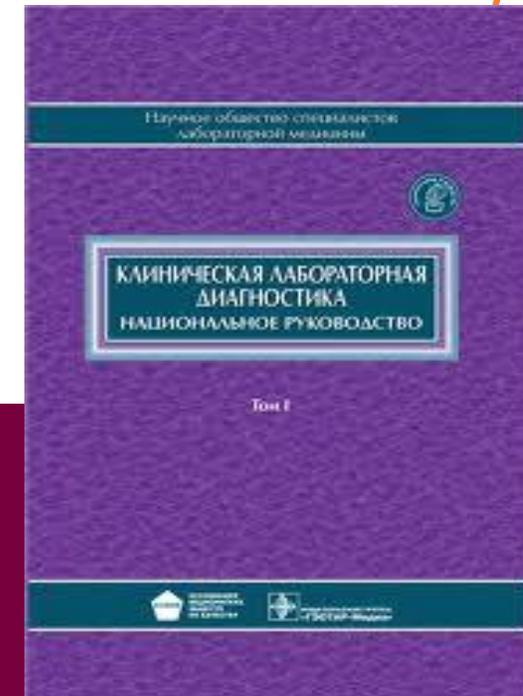
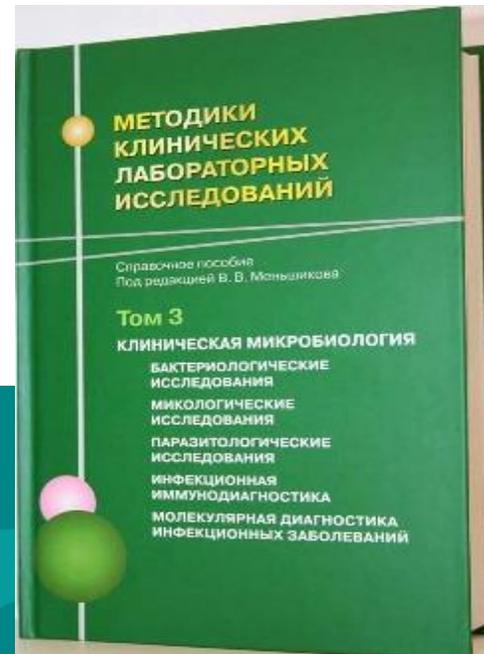
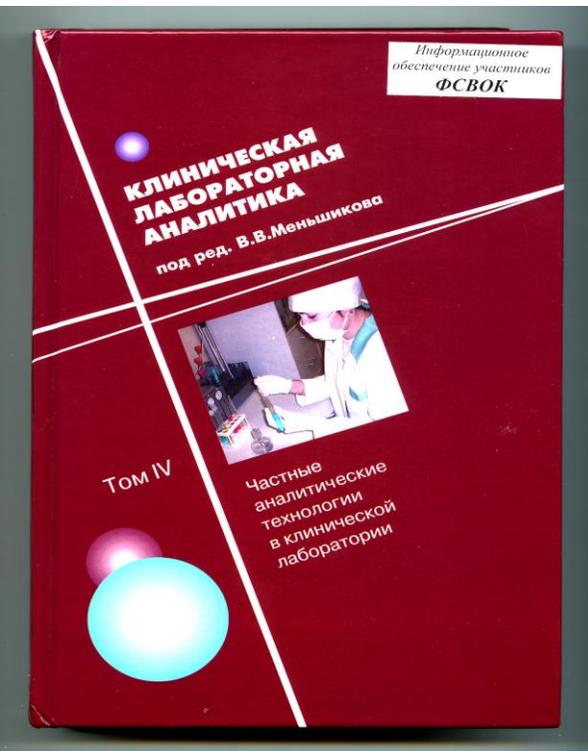
ПРИКАЗ

22 апреля 1985 г.

№ 535

**ОБ УНИФИКАЦИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ
(БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ) МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ,
ПРИМЕНЯЕМЫХ В КЛИНИКО - ДИАГНОСТИЧЕСКИХ
ЛАБОРАТОРИЯХ
ЛЕЧЕБНО - ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ**

Приказ № 535 отменён и новую информацию можно почерпнуть из следующих источников



Техника взятия материала регламентирована методическими указаниями

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ТЕХНИКА СБОРА И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ БИОМАТЕРИАЛОВ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРИИ МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

МУ 4.2.2039-05

**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ
ТЕХНИКА СБОРА И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ
БИОМАТЕРИАЛОВ
В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРИИ
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**

МУ 4.2.2039-05

МУ 4.2.2039-05

1. Область применения

1.2. Методические указания предназначены для использования органами и организациями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут использоваться органами и организациями здравоохранения.

Документ не лишён недостатков:

Цитата из МУ 4.2.2039-05

«В пробах фекалий и рвотных масс с диагнозом «пищевые отравления» (не обязательно микробного происхождения) часто выделяются *C. perfringens*, *S. aureus*. При этом, кишечные интоксикации вызываются токсинами, а не самими микроорганизмами. Такая патология может быть обусловлена наличием, например, нитратов в овощах и фруктах, что, однако, не является препятствием для направления собранной пробы на исследование микробиологам.»



ОТДЕЛЕНИЕ РОССИЙСКОЙ
АССОЦИАЦИИ МЕДИЦИНСКОЙ
ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
по Санкт-Петербургу
и Ленинградской области

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЕДЕНИЮ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Учебно-методическое
пособие



ООО «ГЕМ»



«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель председателя
Комитета по здравоохранению
Правительства Санкт-Петербурга
В.Е. Жолобов

«...» 2007 г.

Бойцов А.Г., Кафтырева Л.А., Ластовка О.Н.,
Чугунова Ю.А., Нилова Л.Ю., Пустынникова А.М.,
Эмануэль В.Л.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЕДЕНИЮ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Учебно-методическое пособие

«СОГЛАСОВАНО»

Главный бактериолог
Комитета по здравоохранению
Правительства Санкт-Петербурга

Кафтырева Л.А.

Учебно-методическое пособие утверждено решением Ученого Совета
Санкт-Петербургской Государственной медицинской академии
им. И.И. Мечникова
5 марта 2007 года

Региональные руководства

Этапы диагностического процесса

1. формулировка задачи и выбор метода исследования;
2. выбор, взятие исследуемого материала, его хранение и транспортировка;
3. проведение исследований;
4. анализ полученных результатов.

Формулировка предварительного диагноза



Новый больной –
новый вопрос



Формулировка предварительного диагноза

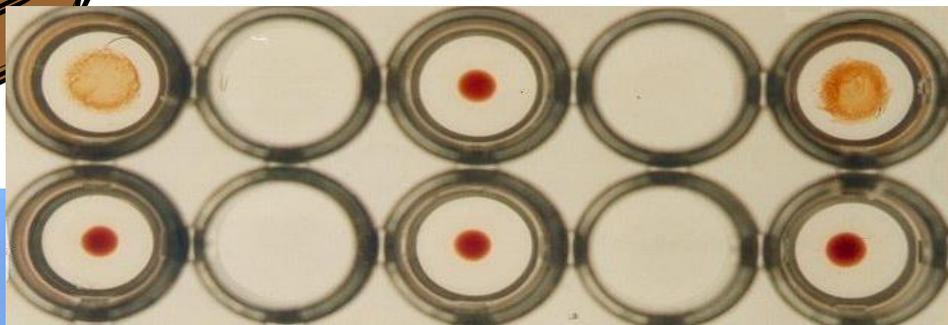
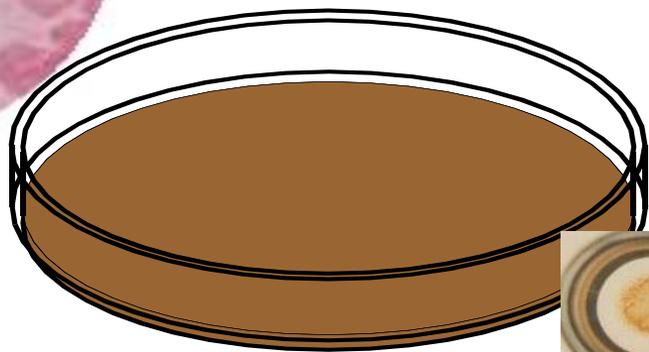
Направо пойдешь - дизентерию найдёшь;
налево пойдешь - кампилобактериоз
найдёшь; прямо пойдешь - ротавирусную
инфекцию найдёшь



Выбор исследуемого материала

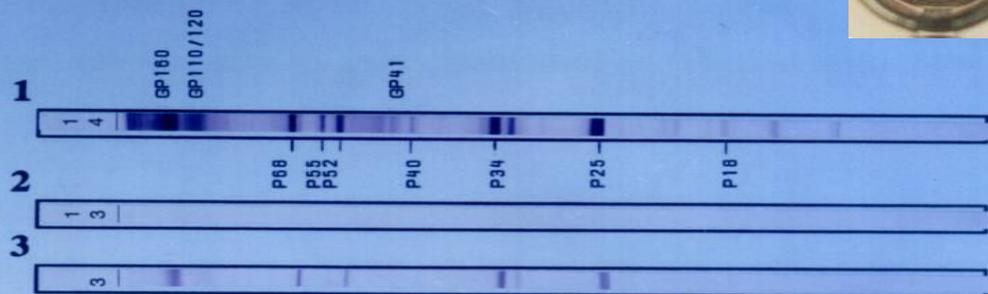


Выбор метода исследования



NEW LAV BLOT I

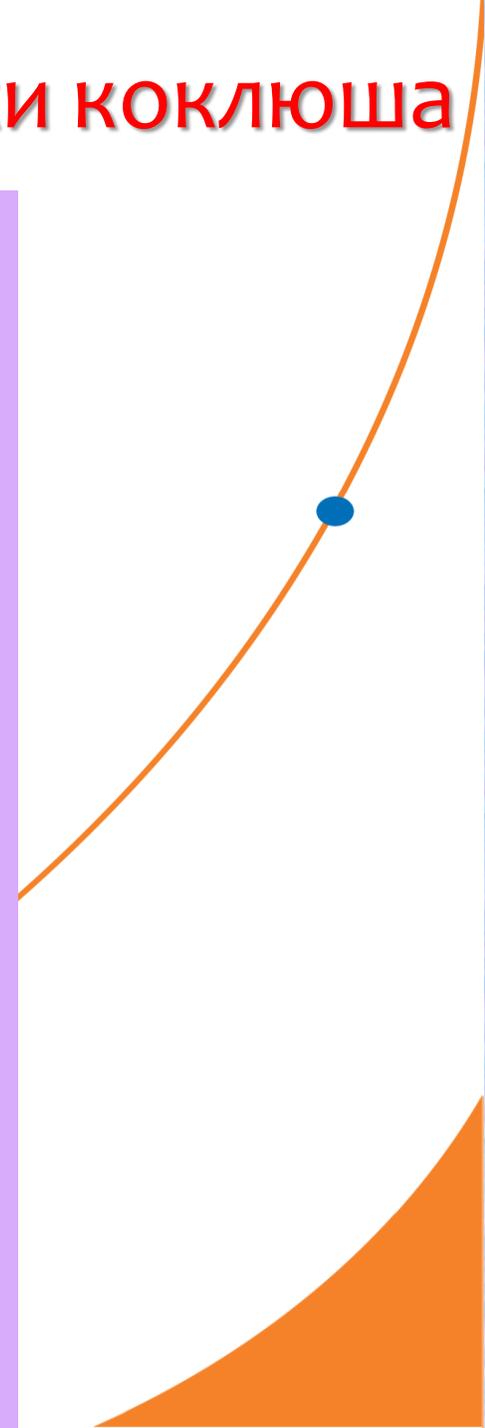
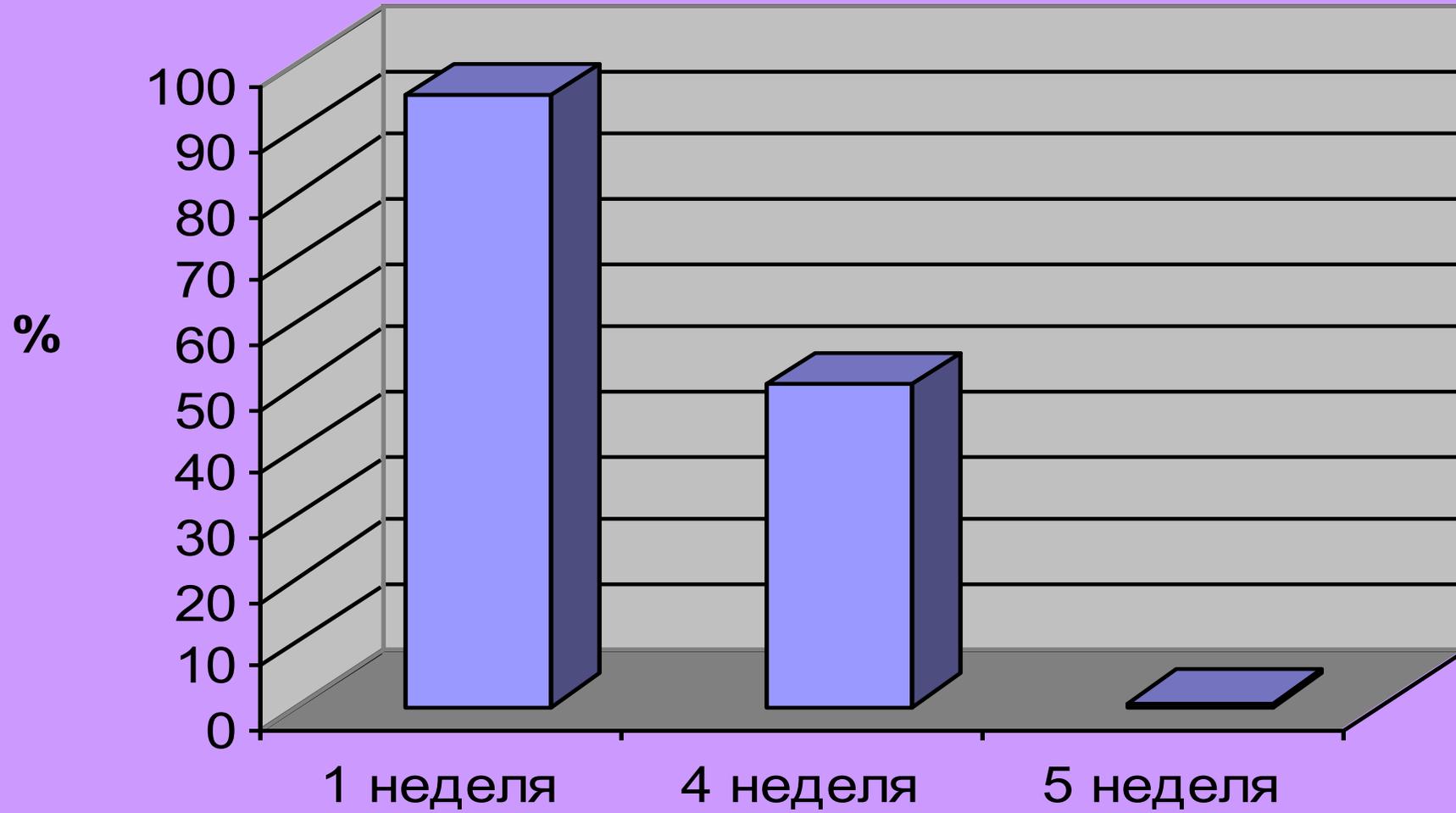
LOT/CH.-B. : 263



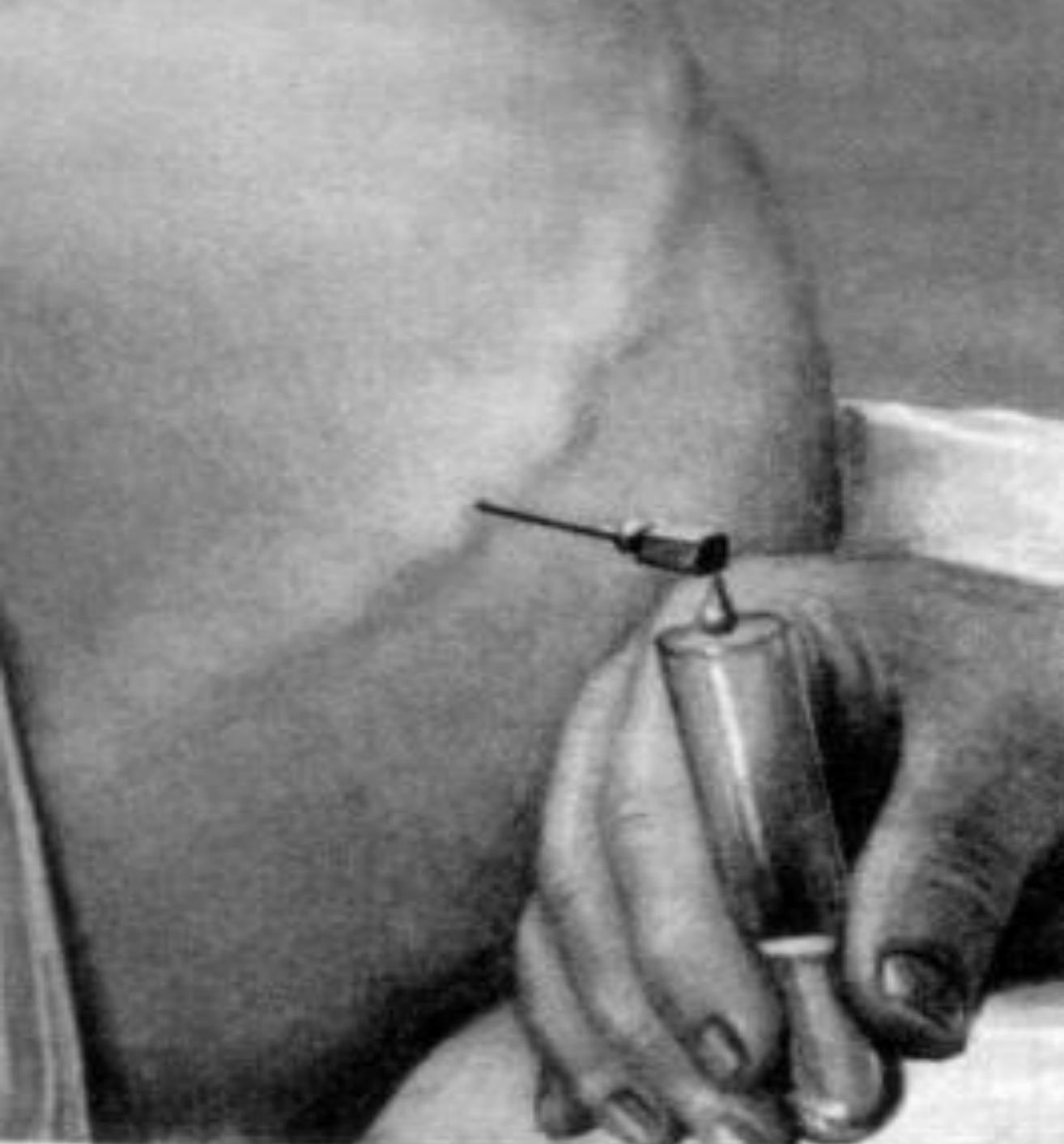
1. *Contrôle Positif R4 / Positive Control R4 .*
2. *Contrôle Négatif R3 / Negative Control R3.*
3. *Sérum Positif Dilué / Diluted Positive Serum .*

sanofi
DIAGNOSTICS
Pasteur

Эффективность бактериологической диагностики коклюша



Взятие материала и его доставка в лабораторию



Проведение исследований

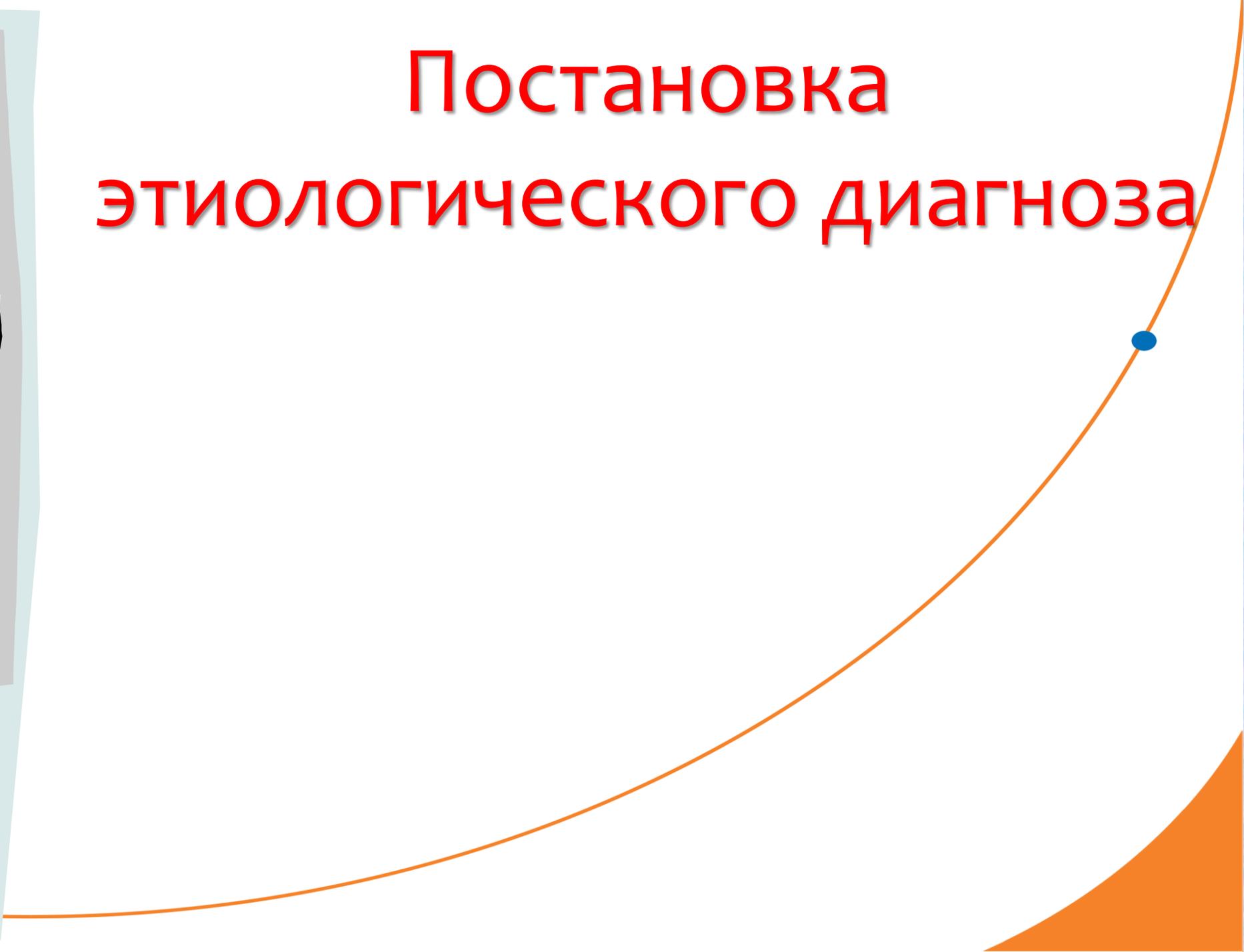


Оценка и трактовка результата





Постановка этиологического диагноза



Патогенные микроорганизмы обнаружены! А они ЭТИОЛОГИЧЕСКИ значимы?

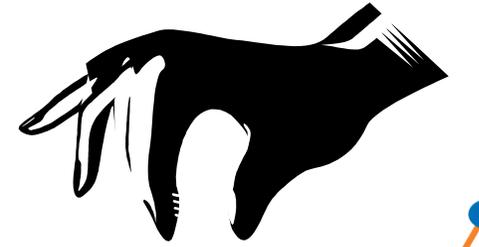
Widal test или РНГА с брюшнотифозным Vi-диагностикумом
положительный

Это: больной брюшным тифом или
брюшнотифозный бактерионоситель, больной гриппом,
сыпным тифом, возвратным тифом и т. п.?

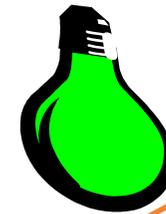
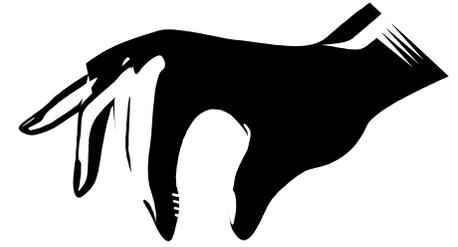
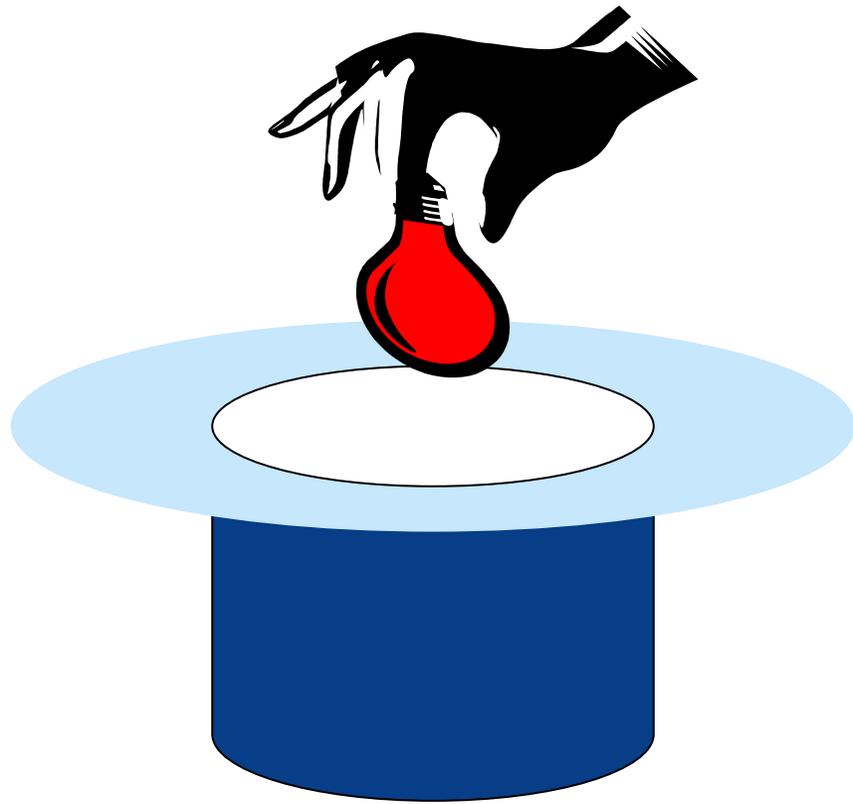
Патогенные микроорганизмы не обнаружены!

Мы не нашли или его там нет ?

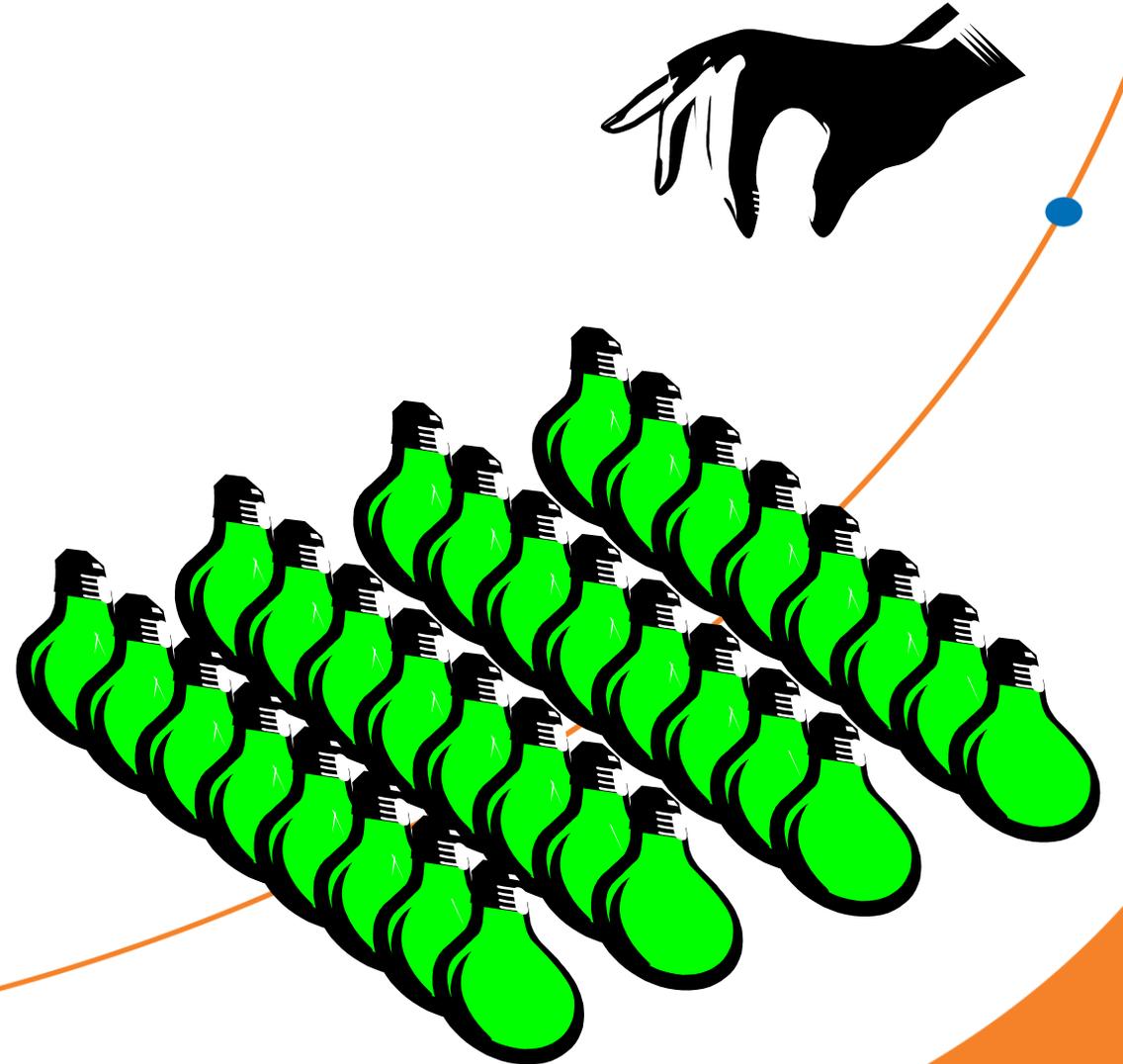
Достоверность качественного обнаружения микроорганизмов



Достоверность качественного обнаружения микроорганизмов



Достоверность качественного обнаружения микроорганизмов



Для наглядности заглянем в санитарную микробиологию



Вагон колбасы - 60 тонн



Проба



Навеска 25 г

Сальмонеллы не обнаружены где?

В вагоне?

В батоне колбасы?

В навеске 25 г?

Среда не сработала?



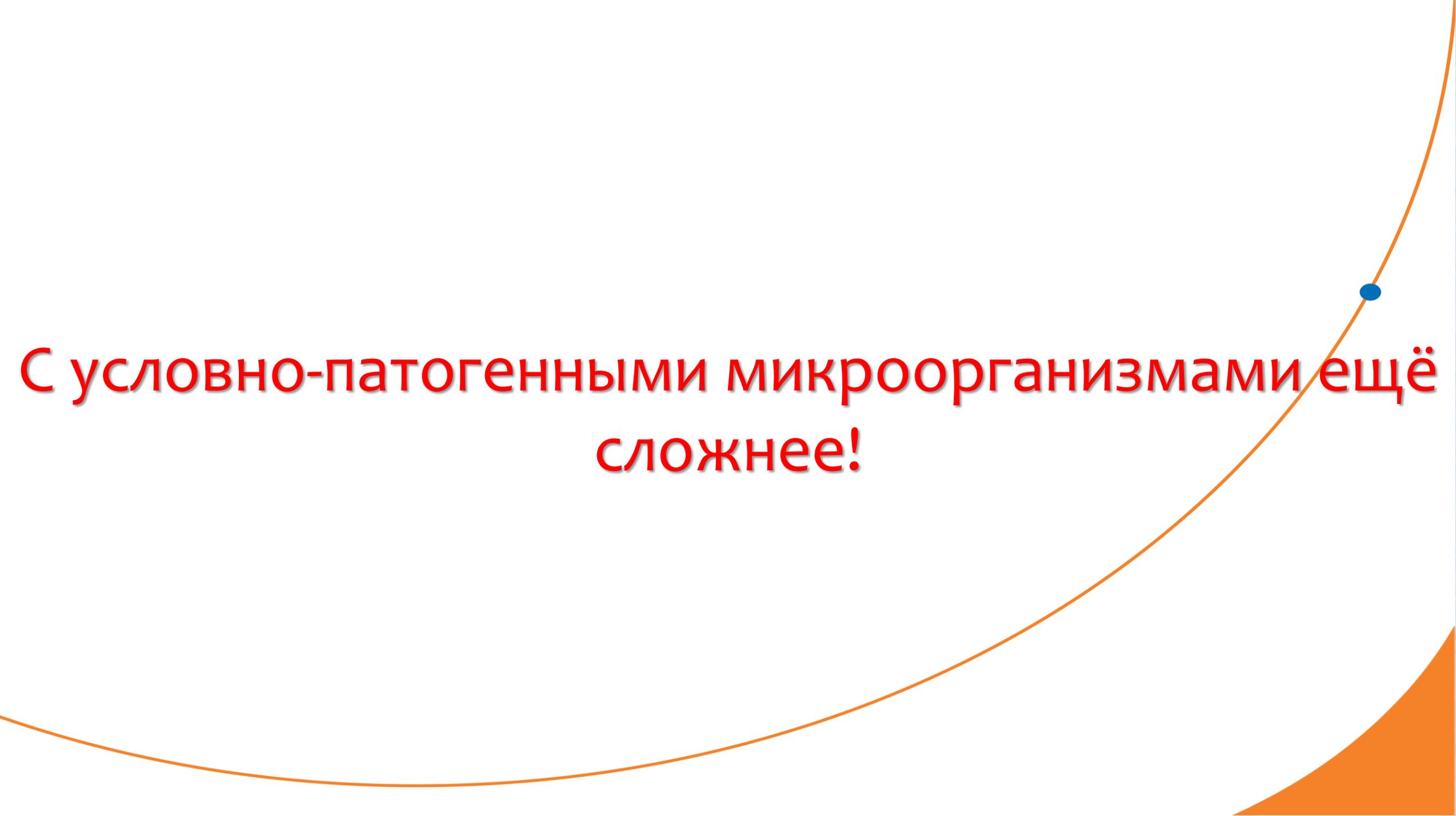
Бактериологическое исследование

Оценка результатов при поиске патогенных микроорганизмов

Положительный результат - он достоверно присутствует

Отрицательный результат - не найден, но может быть:

- его нет в данном образце,
- его нет в данном виде материала,
- метод обнаружения не совершенен,
- и т. д.

A decorative orange curve starts from the bottom left, curves upwards to the right, and then curves downwards to the right. A small blue dot is located on the upper part of this curve. The text is centered horizontally and partially overlaps the curve.

С условно-патогенными микроорганизмами ещё
сложнее!

Критерии оценки клинической значимости находок условно-патогенных микроорганизмов

1. количество микроорганизмов данного вида в материале;
2. отсутствие в материале патогенных микроорганизмов;
3. выделение данного вида микроорганизмов в монокультуре или в ассоциации с другими;
4. частота находок данного вида микроорганизмов в том же виде исследуемого материала у здоровых;
5. повторное выделение одного вида микроорганизмов на протяжении всего заболевания и его исчезновение по мере выздоровления;
6. нарастание титра антител к данному виду микроорганизмов;
7. обнаружение одного и того же вида микроорганизмов у ряда пациентов со сходной клиникой и сходным источником заражения

Методы диагностики инфекционного процесса

1. Индикация инфекционного агента (бактерий, грибов, вирусов, простейших и т. д.):
 - микроскопический метод, базирующийся на прямом наблюдении возбудителя в патологическом материале с помощью различных приёмов микроскопии;
 - культуральный метод, базирующийся на культивировании возбудителя на питательных средах, в организме лабораторных животных, на культурах клеток с целью выделения и последующей идентификации чистой культуры;
 - методы детекции в исследуемом материале продукты, синтезированные микроорганизмами (летучие жирные кислоты при диагностике инфекций, обусловленных неспорообразующими анаэробами; токсины, при диагностике ботулизма);
 - иммунологические методы поиска антигенов возбудителей в исследуемом материале;
 - генетические методы, основанные на обнаружении нуклеиновых кислот возбудителя в пробе
2. Методы выявления активного иммунного ответа, чаще всего нарастания титра антител к возбудителю (серодиагностика) или сенсibilизации (аллергодиагностика).
3. Неспецифические лабораторные тесты, по характеру отклонения которых можно заподозрить патологические изменения, характерные для инфекционных процессов определенной этиологии (изменение активности трансаминаз при вирусных гепатитах)

Залог успеха

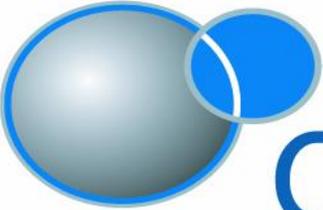
- Комплексный подход - одновременное исследование нескольких видов материала несколькими методами
- Повторность исследований
- Аналитический подход: оценка правдоподобности результата в сочетании с клиническими данными

Что нас ждет завтра?

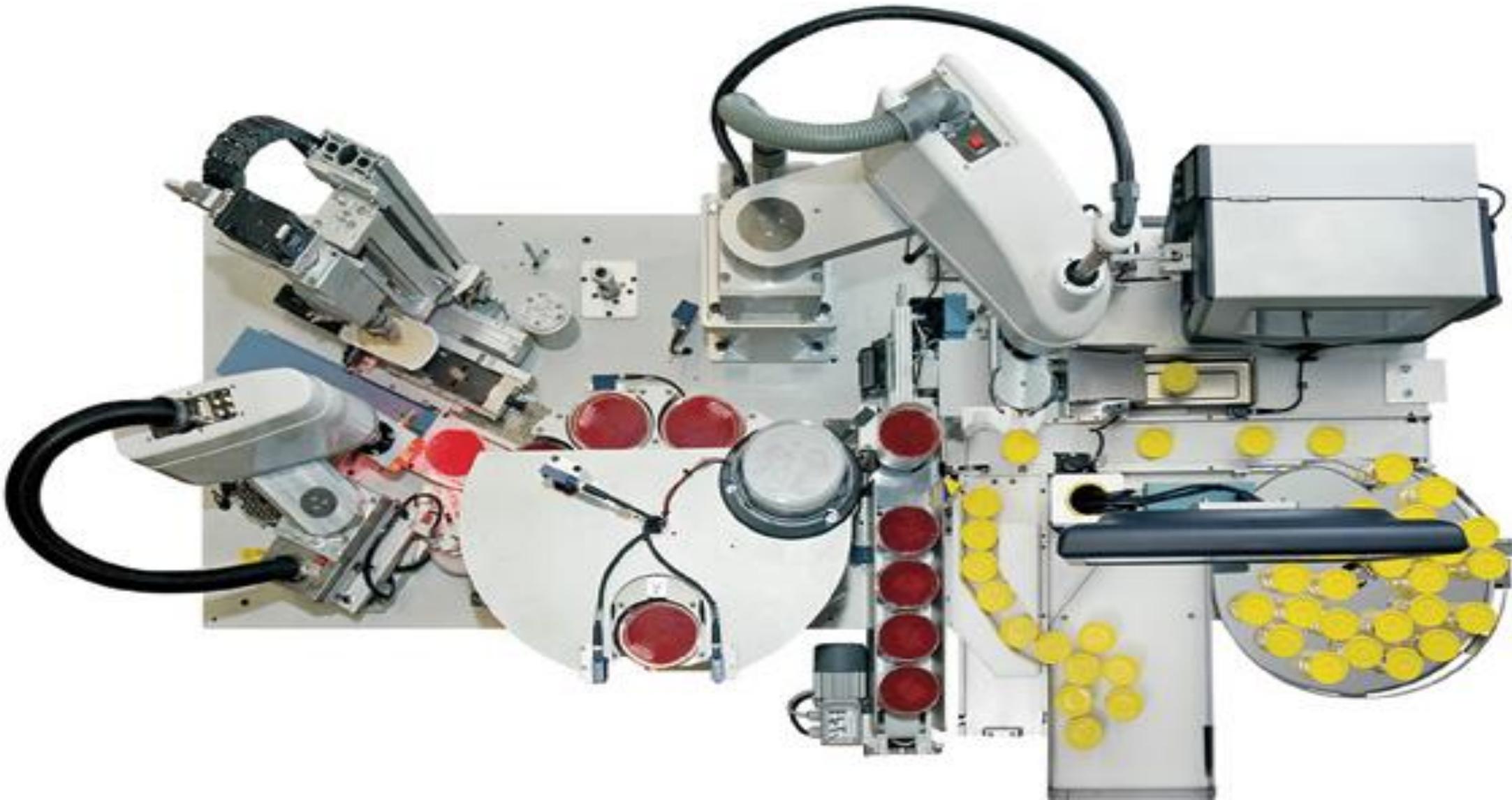
A decorative orange curve starts from the bottom left, curves upwards and to the right, and then curves downwards and to the right, ending at the bottom right. A small blue dot is placed on the curve near the top right. The text "Что нас ждет завтра?" is centered in the middle of the page.

Полностью автоматизированная станция микробиологического посева WASP



**COPAN**
i n n o v a t i o n

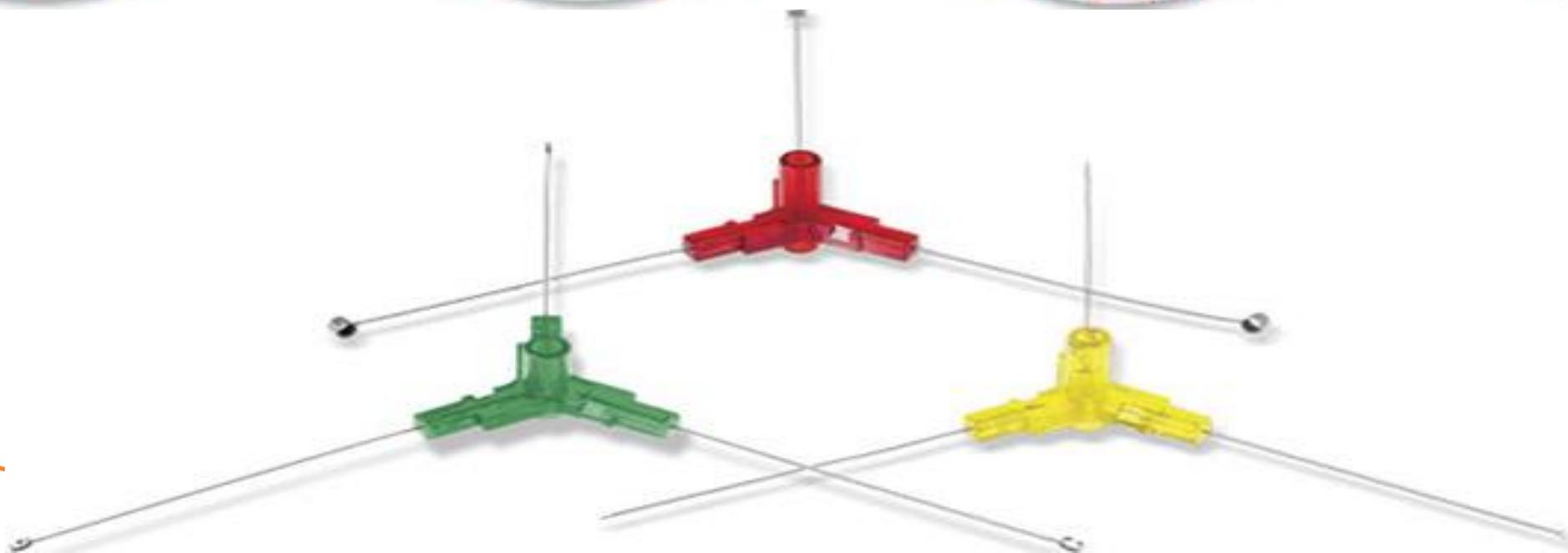
WASP® - Walk-Away Specimen Processor



Преимущества WASP® - Walk-Away Specimen Processor

- пробоподготовка и программирование станции занимают 20 мин;
- высокая производительность - 180 проб в час;
- автоматическая маркировка чашек Петри, в том числе боковая;
- выбор различных вариантов посева штрихом;
- наличие специального блока из трёх никель-хромовых петель, закреплённых на вращающемся устройстве. Устройство имеет цветовую кодировку в соответствии с размером петли (1, 10, 30 мкл) и легко заменяется

Варианты посева штрихом



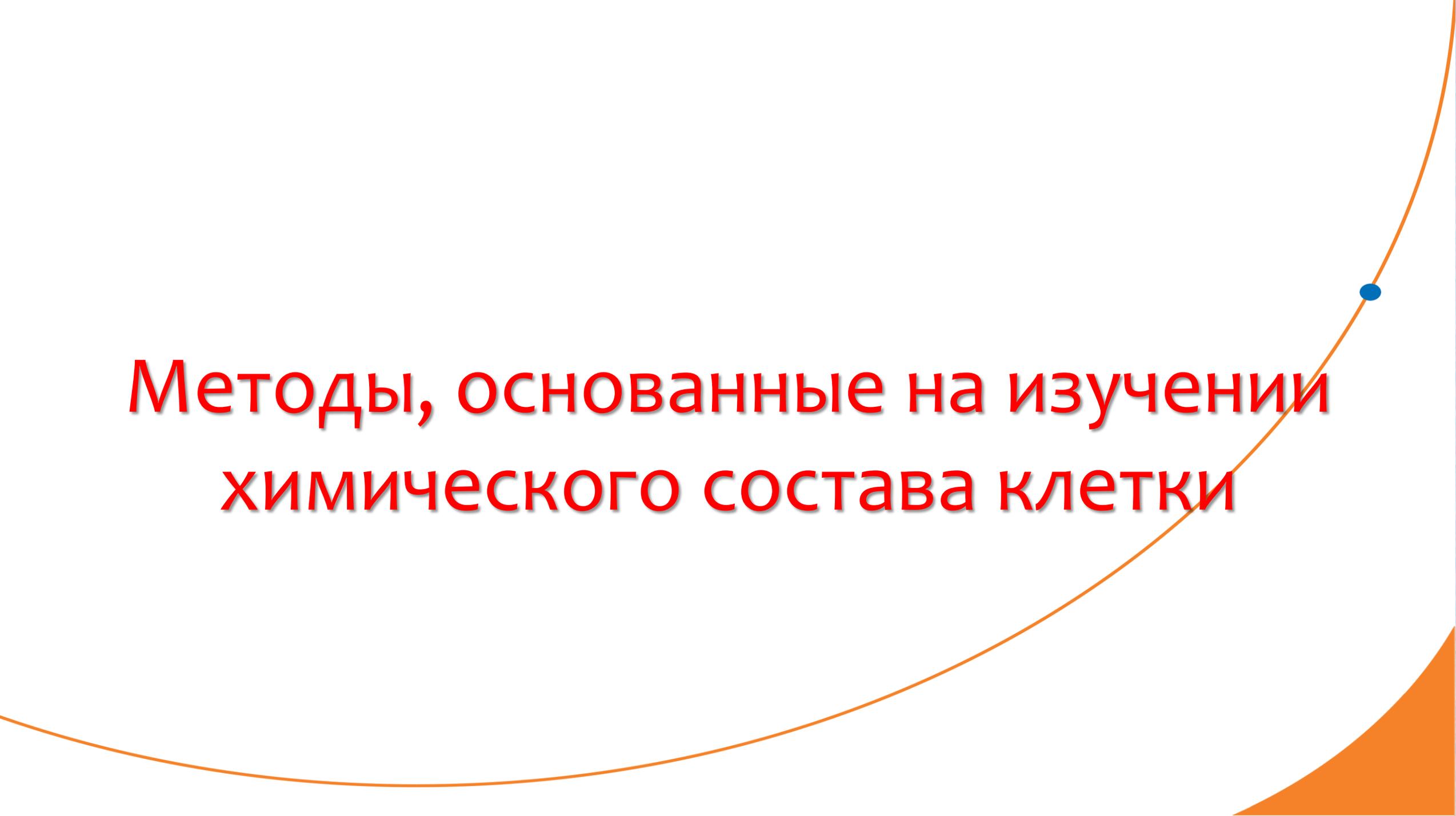
FLOQSwabs™



Жидкие транспортные среды для WASP



- Универсальная система eSwab на основе жидкой транспортной среды AMIES
- Система для сбора, транспортировки и сохранения образцов фекалий (FecalSwab)
- Среда обогащения для выделения Salmonella (seleniteBroth)
- Солевой бульон обогащения с 2,5% NaCl для MRSA (TSBSaltBroth)
- Бульон для выделения и сохранения образцов вагинальной микрофлоры (catBroth)
- Среда обогащения для выделения стрептококков группы В (limBroth)
- Система с дитиотреитолом (ДТТ) для разжижения мокроты (SL Solution)
- Система для сбора, транспортировки и сохранения образцов мочи на бакпосев (UriSwab)

A decorative orange curve starts from the bottom left, goes up and right, and then curves down and right towards the top right corner. A small blue dot is located on the upper right part of this curve.

Методы, основанные на изучении химического состава клетки

Хроматографические методы

- Используют для идентификации бактерий и установления их систематического положения.
- Объекты для исследования - жирные кислоты клеточной стенки, уникальные интермедиаты и конечные метаболиты жизнедеятельности бактерий. Наиболее распространена идентификация короткоцепочечных жирных и тейхоевых кислот методом газо-жидкостной хроматографии.

Система идентификации микроорганизмов Sherlock (США)

Хроматографическая система автоматически определяет состав комплекса жирных кислот, входящих в клетки бактерий или грибов, а затем идентифицирует его, сравнивая с комплексами жирных кислот известных микроорганизмов, которые хранятся в обширной базе данных системы MIDI Sherlock.

Система идентификации микроорганизмов Sherlock (США)



Масс-спектрометрия

физический метод идентификации молекул путём измерения отношения их массы к заряду (m/z) в ионизированном состоянии.



MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

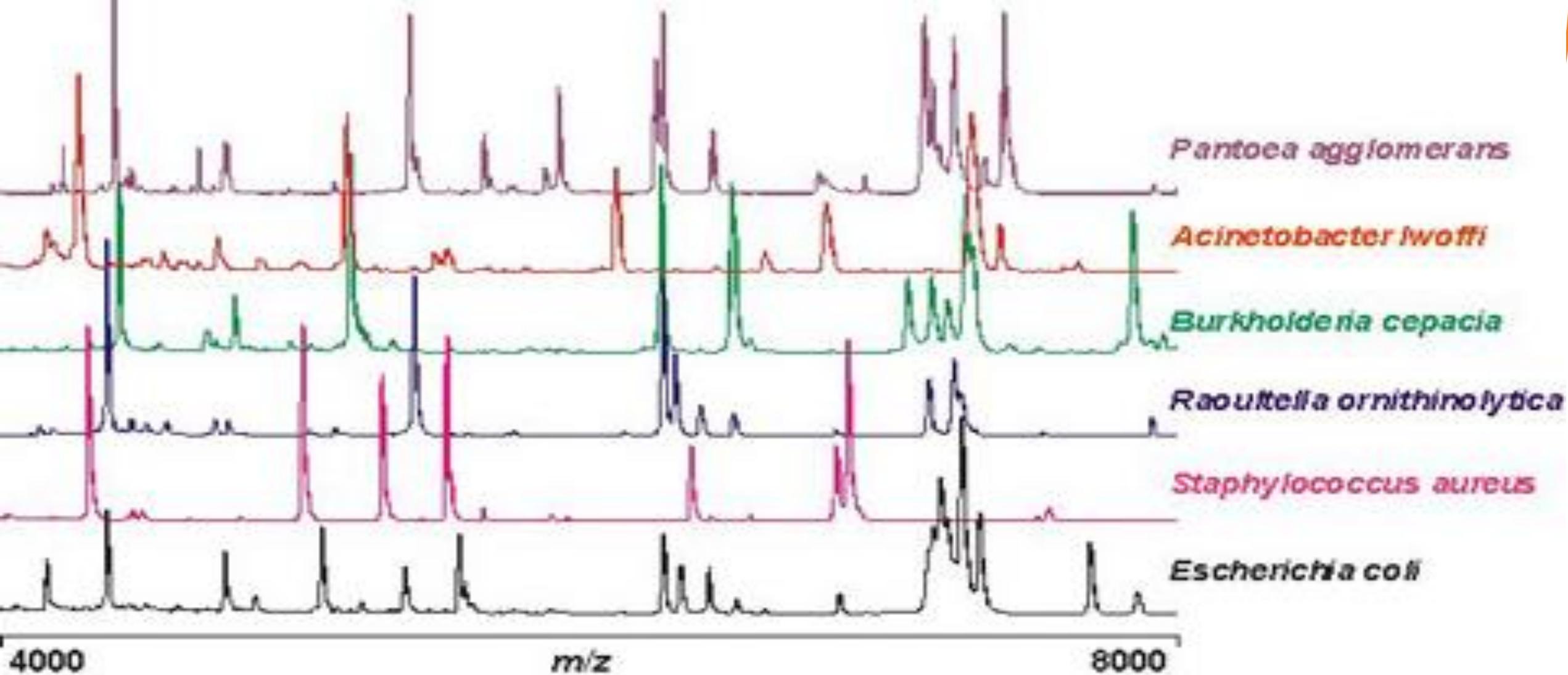
способ ионизации вещества с помощью специальной матрицы и лазерного излучения.

A decorative orange curved line starts from the bottom left, curves upwards to the right, and ends at the top right. A small blue dot is positioned on this line, to the right of the main text.

MALDI-ToF

ToF - Time of Flight - время пролётная масс-спектрометрия.
Масса молекулы оценивается по времени пролёта от источника ионизации до детектора.

A decorative orange curved line starts from the bottom left, curves upwards and to the right, ending at the top right. A small blue dot is placed on the line, positioned vertically between the two lines of text.



ApagnosTec - создатель базы данных для MALDI-TOF MS Microbial Identification

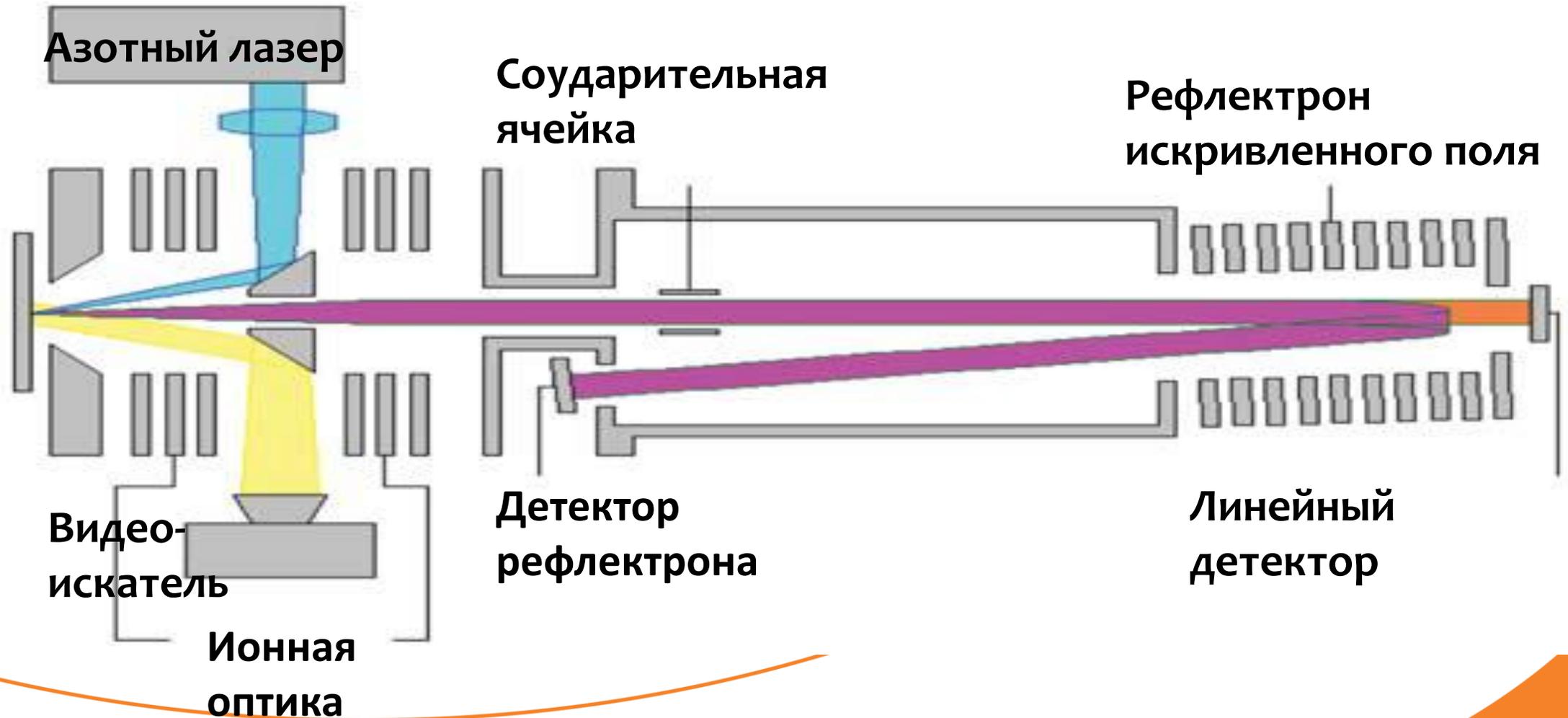
AXIMA@SARAMIS™

SARAMIS™ - (Spectral ARchive And Microbial Identification System) - экспертная система на основе базы масс-спектрограмм интактных микроорганизмов производства SHIMADZU GROUP. Предназначена для типирования микроорганизмов на основании их масс-спектров.

- Заменяет стандартные биохимические методы
- Достоверный результат за две минуты
- Высокая воспроизводимость анализа
- Значительная экономия средств



AXIMA@SARAMIS™



AXIMA@SARAMIS™

По состоянию на начало 2009 года накоплены суперспектры более чем для 1600 видов и 230 родов. В БД SARAMIS™ входит также коллекция первичных масс-спектров микроорганизмов (FingerprintSpectra), состоящая из более чем 50 тыс. образцов.

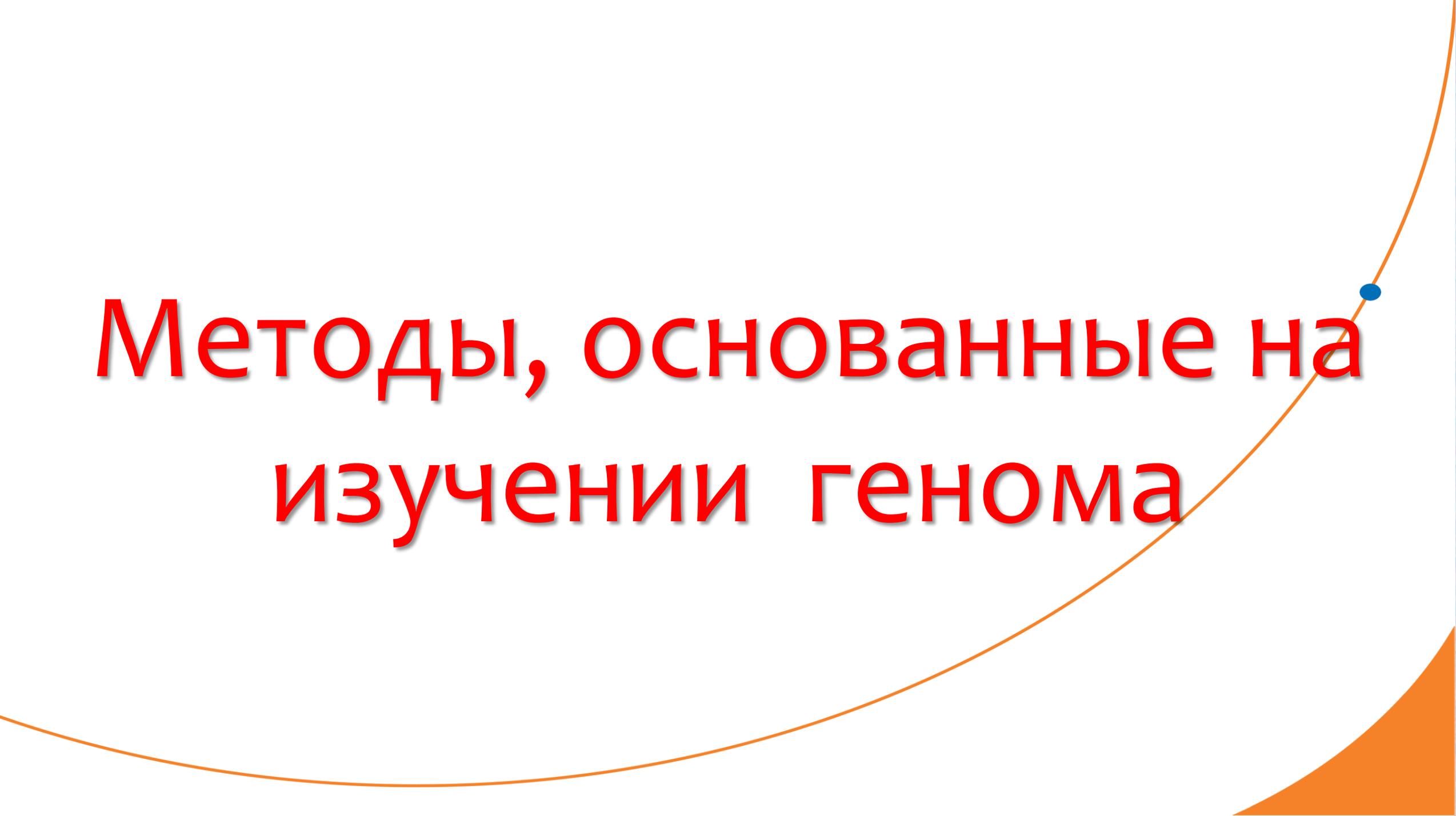
Microflex (Bruker Daltonics, USA)

Время анализа: от нескольких минут для отдельной пробы «от колонии до видовой идентификации» до 1,5 часов для одновременного анализа 96 проб на панели.



- Компания bioMérieux приобрела у компании Anagnostec базы данных идентификации микроорганизмов на платформе матричной лазерной десорбционной времяпролётной масс-спектрометрии (MALDI-ToF-MS)
- Компания bioMérieux подписала соглашение с компанией Anagnostec о приобретении и дальнейшей разработке систем идентификации микроорганизмов на платформе матричной лазерной десорбционной времяпролётной масс-спектрометрии (MALDI-ToF-MS).

Методы, основанные на изучении генома

A decorative orange arc curves from the bottom left towards the top right. A small blue dot is positioned on this arc, near the top right corner of the slide.

Система идентификации бактерий RiboPrinter



- Система DuPont Qualicon RiboPrinter® System идентифицирует почти 7000 видов, охватывающих 200 родов и свыше 1400 видов, подвидов и серотипов бактерий.
- Информация о геноме позволяет системе RiboPrinter делать мгновенный генетический снимок (snapshot), шаблон менее чем за 8 часов.

Система идентификации бактерий RiboPrinter

Этапы работы:

- выделение бактериальной ДНК из исследуемого образца;
- обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции;
- электрофоретическое разделение;
- гибридизация со специфическими мечеными олигонуклеотидными зондами.

Система идентификации бактерий RiboPrinter

Система может применяться для:

- обнаружения бактерий в сырых и готовых продуктах, пробах окружающей среды;
- выявления контаминации чистых культур промышленных микроорганизмов;
- определения источников заражения, отслеживания на уровне штаммов для контроля над процессом производства и окружающей средой.



Производитель -
компания Abbott
Molecular (США)

**PLEX-ID Автоматизированный комплекс для молекулярной диагностики
инфекционных агентов и генетической идентификации ДНК человека**

Достоинства

- Быстрая идентификация (~ 5 часов);
- Не требуется предварительных знаний о наличии предполагаемого агента в пробе, в основе которого лежит точное определение последовательности ДНК, позволяющее идентифицировать и количественно определить все находящиеся в пробе виды патогенов;

Технология PLEX-ID

Процесс



Компоненты автоматизированной системы PLEX-ID

- Bruker Daltonics высокоточный масс-спектрометр для анализа масс ПЦР-ампликонов на платформе ESI-ToF (электро-спрей ионизация и времяпролётная масс-спектрометрия);
- Специальный блок для удаления солей из смеси ПЦР-ампликонов на основе магнитных частиц (Omnic);
- Роботизированные манипулятор и держатели планшетов Thermo Electron CataLyst Express (для манипуляции с пятнадцатью 96-луночными планшетами, планшетами с магнитными частицами и планшетами для образцов);
- Автоматическое термозапаивающее устройство для 96-луночных планшетов Biosystems WASP;
- Два компьютера с двойным процессором Intel Xeon и подсистема EonStor/SCSI to SATA RAID, отвечающая за контроль аналитической системы и базы данных.



Благодарю за внимание

Москва



АКАДЕМИЯ
ПОСТДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБУ ФНКЦ ФМБА РОССИИ

Кафедра Клинической лабораторной
диагностики и патологической
анатомии

 **Денисова**
 **Ольга**
 **Владимировна**

 **Телефон +7-985-644-**
 **80-90 (в том числе**
 **вотсапп)**
 **[email.com](mailto:denisova_ov@inbox.ru)**
denisova_ov@inbox.r
u