

Федеральное медико-биологическое агентство
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт гематологии
и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

**АЛГОРИТМ ВЫЯВЛЕНИЯ
И ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ
БАКТЕРИЙ В КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА**

Методические рекомендации

Санкт-Петербург
2017

ВВЕДЕНИЕ

Алгоритм выявления и видовой идентификации бактерий в крови с использованием молекулярно-биологического метода. Методические рекомендации. 2017. — СПб., Агентство «ВиТ-принт», 2017. — 16 с.

Методические рекомендации посвящены методу выявления и видовой идентификации бактерий в крови с использованием полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени». Предлагаемый метод может найти применение при обследовании больных с подозрением на инфекции кровотока у различных категорий больных. Разработанный алгоритм позволяет проводить видовую идентификацию бактерий и генетических маркеров их антибиотикорезистентности, а также микромицетов в крови в более ранние сроки по сравнению с общепринятыми микробиологическими методами. Это дает возможность своевременно назначать и корректировать целенаправленную противомикробную терапию.

Предназначены для специалистов, занимающихся лабораторной диагностикой инфекционных заболеваний и осложнений, а также для инфекционистов, терапевтов, педиатров, гематологов и врачей других специальностей.

Область применения: бактериология, клиническая лабораторная диагностика, гематология, хирургия, педиатрия.

Авторы: С. С. Бессмельцев, А. В. Четкин, В. Н. Чеботкевич, Е. Е. Киселева, Е. И. Кайтанджан, Н. П. Стижак, В. В. Бурылев

Рецензенты: доктор медицинских наук, профессор Г. Е. Афиногенов
доктор медицинских наук, профессор В. А. Исаков

Организация-разработчик: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

*Утверждены заместителем руководителя
Федерального медико-биологического агентства
М. В. Забелиным 5.05.2017, Рег. № 030-2017*

*Введение в действие — с момента утверждения
Введены впервые*

© Коллектив авторов, 2017
© ООО «Агентство “ВиТ-принт”», 2017

Актуальность проблемы ранней диагностики бактериемии и сепсиса обуславливается тем, что генерализованные бактериальные инфекции являются тяжелыми осложнениями у гематологических больных, пациентов отделений интенсивной терапии, а также у лиц, подвергающихся воздействию неблагоприятных экологических и производственных факторов (ионизирующее излучение, компоненты ракетного топлива и др.) и других иммунокомпрометированных больных [1]. Летальность от сепсиса может достигать 60–80 %, причем при задержке этиотропного лечения вероятность летального исхода с каждым часом повышается на 5–7 % [2]. Успех в лечении сепсиса определяется правильностью выбора стартовой эмпирической антибактериальной терапии, так как существующие микробиологические методы диагностики позволяют выявить возбудителя слишком поздно для принятия своевременных лечебных мер. Поэтому существует настоятельная необходимость совершенствования методов ранней диагностики бактериемии и сепсиса.

На основании литературных и собственных данных был определен спектр основных возбудителей бактериемии и сепсиса (более 95 %) [3, 4].

Культуральные методы на данный момент остаются «золотым стандартом» выявления бактерий. Появление автоматических бактериологических анализаторов позволило значительно ускорить выявление бактерий в крови при сепсисе. В то же время внедрение молекулярно-биологических методов выявления бактерий сталкивается с целым рядом проблем: таких как большое количество ингибиторов (белков плазмы и др.), человеческой ДНК, затрудняющих прохождение полимеразной цепной реакции. Кроме того, возможно получение ложноположительных результатов, т. к. метод определяет ДНК как живых, так и погибших бактерий [5]. Работа с гемокультурами лишена этих недостатков [6].

В методических рекомендациях описан оптимизированный алгоритм выявления и идентификации бактерий в крови с использованием молекулярно-биологического метода.

Суть предлагаемого метода заключается в выявлении бактериальных возбудителей в крови при бактериемии и сепсисе с помощью автоматического бактериологического анализатора с последующей родовой и видовой идентификацией молекулярно-биологическим методом (ПЦР в «реальном времени»).

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в «реальном времени»

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III — IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней».

СП 1.3.2518-09 Дополнения и изменения N1 к СП 1.3.2322–08 «Безопасность работы с микроорганизмами III — IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней».

МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I — IV групп патогенности».

СП 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ТРЕБОВАНИЯ К ПОМЕЩЕНИЯМ И ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ

1. Планировка помещений лаборатории и организация работы по проведению ПЦР исследований осуществляют в соответствии с МУ 1.3.2569–09.
2. При контакте с исследуемым материалом необходимо соблюдать меры предосторожности, изложенные в СП 1.3.2322–08, СП 1.3.2518–09.
3. Утилизацию исходных субстратов и отходов ПЦР исследования проводят в соответствии с СанПиН 2.1.7.2527–09, МУ 1.3.2569–09.

ОСНОВНЫЕ НОРМАТИВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Стандартное оборудование для бактериологической и ПЦР-лаборатории отечественного и зарубежного производства, имеющее номера Государственной регистрации в Российской Федерации: автоматический бактериологический анализатор, амплификаторы, анализаторы нуклеиновых кислот.

Флаконы для бактериологического анализатора.

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером на 0,5–10 мкл, 1–200 мкл и 1–1 тыс. мкл.

Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл.

Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР на 0,2 мл (плоская или выпуклая крышка в зависимости от типа используемого прибора).

Набор реагентов для выделения ДНК из гемокультуры.

Наборы реагентов для обнаружения ДНК бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, рода *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*

Набор реагентов для обнаружения ДНК основных грамотрицательных возбудителей гнойно-септических инфекций: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Набор реагентов для обнаружения ДНК *Escherichia coli*.

Набор реагентов для обнаружения ДНК *Enterococcus spp.*

Набор реагентов для обнаружения ДНК грибов рода *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis*).

Набор для выявления ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.*

Набор реагентов для выявления генов приобретенных карбапенемаз групп КРС и ОХА-48-подобных (типы ОХА-48 и ОХА-162).

Набор реагентов для выявления генов приобретенных карбапенемаз класса металло- β -лактамаз (МБЛ) групп VIM, IMP и NDM.

1.2. Подготовка материала для исследований

Взятие крови осуществляется во флаконы для бактериологического анализатора в соответствии с инструкцией изготовителя.

1.3. Проведение анализа и учет результатов

Анализ и учет результатов микробиологического исследования проводится в соответствии с инструкцией по использованию автоматического бактериологического анализатора.

Молекулярно-биологический анализ, включая выделение ДНК из гемокультуры, и учет результатов реакции проводится в соответствии с инструкцией по применению наборов реагентов для обнаружения ДНК бактерий и грибов рода *Candida*, а также наборов для определения антибиотикорезистентности бактерий.

2. АЛГОРИТМ ВЫЯВЛЕНИЯ И ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ В КРОВИ

Алгоритм выявления и видовой идентификации бактерий, схематично представленный на рисунке 1 и состоит в следующем: производится посев и культивирование крови в бактериологическом анализаторе. При наличии роста, из флакона, содержащего положительную гемокультуру, отбирается проба для проведения родовой и видовой идентификации молекулярно-биологическим методом. Если выявляются грамотрицательные бактерии, то пробу дополнительно тестируют на наличие карбапенемаз; при выявлении *Staphylococcus spp.*, проводится дополнительное тестирование для определения метициллин-резистентности, после чего общий результат анализа сообщается врачу. При отсутствии роста в течение 7 суток врачу сообщается результат — «роста нет».

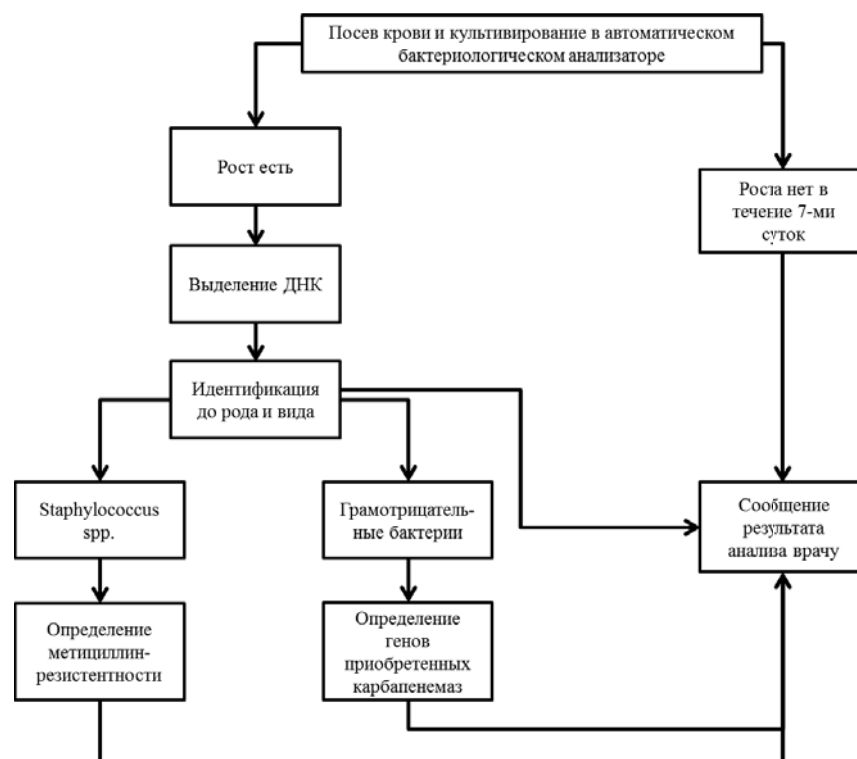


Рисунок 1. Схема алгоритма выявления и видовой идентификации бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные бактериологическим и молекулярно-биологическим методами, хорошо согласуются. Метод ПЦР-РВ позволяет выявить маркеры антибиотикорезистентности у бактерий. Кроме того, ПЦР-РВ позволяет существенно сократить сроки проведения идентификации микроорганизмов и определения маркеров антибиотикорезистентности (от 3–5 дней до 5–7 часов), а также дополнить возможности идентификации сложно дифференцируемых видов.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Возбудители сепсиса у иммунокомпрометированных больных: структура и проблемы антибиотикорезистентности (результаты многоцентрового исследования) / Г.А. Клясова, Л. Л. Сперанская, А. В. Миронова и др. // Гематол. и трансфузиол. — 2007. — Т. 52, № 1. — С. 11–18.
2. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock / A. Kumar, D. Roberts, K. E. Wood et al. // Crit Care Med. — 2006. — Vol. 34, N6. — P. 1589–1596.
3. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis / H. Westh, G. Lisby, F. Breyse et al. // Clin. Microbiol.Infect. — 2009. — Vol.15. — P. 544–551.
4. Этиология бактериемий и сепсиса у больных гемобластозами / Е. Е. Щетинкина, В. В. Бурылев, Е. И. Кайтанджан и др. // БИОМЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ Medline.ru — 2014. — Т. 15. — С. 511–518.
5. Evaluation of the time for which real-time polymerase chain reaction detects dead bacteria / H. Choe, Y. Inaba, N. Kobayashi et al.// Polish Journal of Microbiology. — 2014. — Vol.63, N.4. — P. 393–398.
6. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform an observation study / P. Tissari, A. Zumla, E. Tarkka et al./ Lancet. — 2010. — Vol. 375. — P. 224–230.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Обозначения и сокращения.....	4
Нормативные ссылки	5
Требования к помещениям и технике безопасности.....	6
Основные нормативные положения.....	7
1. Порядок проведения исследования	7
1.1. Аппаратура, материалы и реактивы.....	7
1.2. Подготовка материала для исследований	8
1.3. Проведение анализа и учет результатов.....	8
2. Алгоритм выявления и видовой идентификации бактерий в крови.....	9
Заключение	10
Библиография	11

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

АЛГОРИТМ ВЫЯВЛЕНИЯ И ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ В КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА

Методические рекомендации

Технический редактор: *Кронберг Т. В.*
Компьютерная верстка: *Дмитриева О. С.*

Бумага офсетная «Светокопи». Печать офсетная.
Гарнитура «Calibri». Подписано в печать 20.05.2017 г.

Печ. л. 1. Формат 60×90 ¹/₁₆.

Тираж _____ экз. Заказ № _____

Отпечатано в типографии ООО «Агентство “ВиТ-принт”».
191167, Санкт-Петербург, наб. Обводного канала, д. 23, лит. Б.

Тел.: (812) 612-40-92, 612-40-93

E-mail: vit-print@mail.ru