

Современные возможности автоматизации в микробиологии

Лысенко А.С., к.м.н.

Директор отдела поддержки клиентов ООО «биоМерье Рус»

Традиционные подходы к проведению исследований в клинической микробиологии, подразумевающие преимущественное использование неавтоматизированных технологий, часто не обеспечивают должного качества и сроков получения результата. Несвоевременность результата (а порой и недоверие к нему со стороны врачей-клиницистов) заставляет ЛПУ тратить существенную часть бюджета на дорогостоящие современные противомикробные препараты широкого спектра действия для эмпирической терапии инфекций в попытках скомпенсировать недостатки микробиологического анализа. Переломить эту ситуацию способна коренная модернизация микробиологических лабораторий, позволяющая автоматизировать важнейшие процессы исследования.

В последнее время клиническая микробиология характеризуется целым рядом инновационных изменений, способных принципиально улучшить диагностический процесс. Свое решение по автоматизации микробиологических лабораторий, затрагивающее практически все этапы исследования – от посева образцов до получения результатов определения чувствительности к антибиотикам – предлагает компания bioMérieux (Франция), являющаяся мировым лидером по производству приборов и реагентов для лабораторной диагностики, хорошо известных в нашей стране.

Получение чистой культуры микроорганизма является отправной точкой для определения вида возбудителя и его чувствительности к антибиотикам. Сроки получения чистой культуры микроорганизма связаны с качеством посева биологического материала на питательные среды. Эта традиционно выполняемая вручную процедура занимает основное время среднего персонала лаборатории, а качество ее выполнения связано с квалификацией и опытом лаборантов. В настоящее время появилась возможность автоматизации этого принципиального для лаборатории процесса с помощью прибора для инокуляции чашек Петри – PREVI Isola.

PREVI Isola отличается высокой производительностью (до 180 чашек Петри в час), обеспечивает стандартное

качество посева, высокий процент изоляции колоний, отсутствие перекрестной контаминации, полную прослеживаемость процесса (включая автоматический выбор панели сред и маркировку чашек Петри), а также безопасность для оператора.

Показано, что при посеве одинакового количества чашек с использованием PREVI Isola требуется практически вдвое меньше времени [1] в сравнении с посевом вручную. Например, при посеве образцов мочи на 100 чашек экономия в сравнении с рутинным методом составляла 1 час [2]. При этом количество изолированных колоний при использовании PREVI Isola увеличивается в среднем более чем на 20% [3]. Это позволяет сократить необходимость повторных пересевов и иметь окончательный результат исследования с определением вида микроорганизма и его чувствительности к антибиотикам в более короткий срок.

Количество изолированных колоний при использовании PREVI Isola повышается за счет рационального способа посева, позволяющего максимально эффективно использовать площадь поверхности агара. При этом подсчет колоний, например, при посеве образцов мочи даже облегчается [4].

Важно, что количественные показатели, достигаемые при использовании PREVI Isola, в результате приводят к повышению качества диагностики инфекционных заболеваний. Показано, что за полугодовой период использования PREVI Isola для посева образцов фекалий уровень выявления таких кишечных патогенов как *Shigella* и *Salmonella* вырос на 50%, а *Campilobacter* обнаруживался более чем втрое чаще [5].

Доминирующий в настоящее время метод микробиологической диагностики бактериемии, подразумевающий использование приготовленных в лаборатории сред, ручное встряхивание флаконов и визуальный контроль роста, характеризуется значительным количеством ложноотрицательных результатов, особенно в педиатрии, где используются существенно меньшие количества крови, а также у больных, получающих противомикробную терапию. В лаборатории это сопровождается высокой загруженностью персонала, в клинике – затрудняет интерпретацию

результатов, приводит к удлинению сроков госпитализации и необоснованному применению антибиотиков. По мнению специалистов, занимающихся лечением пациентов с сепсисом, «использование приготовленных в лаборатории питательных сред для гемокультуры... должно быть исключено», а «наилучшие результаты удается получить при использовании сред промышленного производства (флаконов) в сочетании с автоматическими анализаторами роста бактерий» [6].

Анализаторы гемокультур заметно улучшают выявление септических состояний. Например, анализатор Bact/ALERT позволяет автоматизировать процессы инкубации, встряхивания образца и контроля микробного роста. При его использовании средняя скорость обнаружения роста бактерий составляет в среднем 16,6 часов, что оказывается примерно втрое быстрее по сравнению с рутинным методом. При этом бактериемия обнаруживается в два раза чаще, а процент ложноположительных результатов оказывается ниже [7]. Опыт применения Bact/ALERT в педиатрии показал, что 95% важнейших в детской практике возбудителей (*Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacteriaceae*, включая *Salmonella*, *Neisseria meningitidis*, стрептококки групп А и В) идентифицируются в течение первых суток [8].

Состав сред во флаконах Bact/ALERT оптимален для роста любых обнаруживаемых в крови микроорганизмов, даже для таких прихотливых, как бактерии группы НАСЕК, *Neisseria* и *Haemophilus*. Использование флаконов с ингибиторами антибиотиков позволяет на треть повысить вероятность обнаружения бактериемии у больных, получающих антимикробную терапию [9]. Причем рост бактерий выявляется и при отсроченной загрузке флаконов в анализатор (в случаях, когда невозможно доставить их в лабораторию непосредственно после взятия крови) [10].

Анализаторы Bact/ALERT помимо диагностики бактериемии могут быть использованы для выявления возбудителей в других биологических жидкостях (ликворе, плевральной, синовиальной), в том числе для выявления микобактерий в мокроте и крови, что позволяет проводить лабораторную диагностику туберкулеза.

Флаконы Bact/ALERT отличаются высоким профилем безопасности, так как являются ударопрочными (изготовлены из пластика) и позволяют при взятии крови обходиться без использования шприцев – кровь из вены может поступать непосредственно во флакон через специальный адаптер. Существующие модели анализаторов Bact/ALERT характеризуются различной величиной максимальной единовременной загрузки – имеются приборы емкостью на 60, 120 и 240 флаконов. В случае необходимости (при росте потока исследований) производительность

Bact/ALERT можно увеличивать, подключая дополнительные модули.

Окраска мазков по Граму является неотъемлемым этапом микробиологического анализа и согласно регламентирующим документам она обязательна при исследовании практически любого биологического материала [11]. От информативности мазка нередко зависит правильность диагностики и эффективность лечения. Показано, что антимикробная терапия, назначенная с учетом результатов просмотра мазков, окрашенных по Граму сопровождалась лучшими клиническими результатами при уменьшении количества используемых препаратов и продолжительности госпитализации [12].

Одной из наиболее подходящих для использования в практике микробиологических лабораторий систем для автоматического окрашивания является прибор PREVI Color Gram. Мазки, приготовленные с помощью PREVI Color Gram, были в 99,15% случаев выше по качеству при сравнении со стандартным ручным методом окрашивания по Граму [13]. Важным преимуществом также является экономия дорогостоящих красителей: расход кристаллического фиолетового составляет всего 5,5 мл на окраску 30 препаратов [14].

Прибор отличается достаточно высокой производительностью – до 300 препаратов в час, в то же время он может быть эффективно применен для окрашивания одного или нескольких препаратов. При этом время, затрачиваемое на всю процедуру окрашивания (вместе с фиксацией, также выполняемой автоматически), составляет около 5 мин [14]. Наличие специального контейнера для сбора отходов позволяет расположить PREVI Color Gram в любом месте лаборатории.

Идентификация и определение чувствительности к антибиотикам дают врачу-клиницисту необходимую информацию для назначения рациональной противомикробной терапии. При использовании рутинных методов этот этап оказывается наиболее сложным для лаборатории, так как требует от персонала значительного времени и высокой компетентности при формулировке окончательного заключения. Наиболее важен и сложен для интерпретации аспект выявления механизмов микробной резистентности к антибиотикам, которая в настоящее время широко распространена.

Анализатор VITEK 2 является современной системой для идентификации и определения чувствительности к антибиотикам. К их преимуществам относятся быстрота и высокое качество идентификации и определения чувствительности. Точность идентификации при использовании VITEK 2 составляла 97,3% для грамотрицательных палочек, 95,8% для грамположительных кокков и 98,5%

для грибов. Более 90% изолятов грамотрицательных палочек были идентифицированы в течение 7 часов, а грамположительных кокков – в течение 3 часов [15, 16, 17]. Грибы были идентифицированы в пределах 18 часов [17].

Опыт лабораторий показывает, что использование VITEK 2 позволяет существенно расширить спектр диагностируемых инфекций за счет включения в него редких возбудителей, снизить трудозатраты персонала и сэкономить ресурсы, расходующиеся на приготовление питательных сред, автоклавирование, мытье посуды и прочее [18].

Принципиальным моментом исследования с использованием VITEK 2 является высокое качество определения чувствительности возбудителей к антибиотикам. Оно объясняется широким спектром тестируемых антимикробных препаратов (до нескольких десятков при использовании 1 карты), возможностью определять их минимальную ингибирующую концентрацию, а также наличием экспертной системы, обеспечивающей выявление механизмов резистентности к антибиотикам и способной прогнозировать их терапевтическую эффективность.

Точность при определении чувствительности к антимикробным препаратам бактерий составляла 97,7%, причем корректно определялись такие механизмы резистентности как бета-лактамазы расширенного спектра действия, устойчивость стафилококков к оксациллину (MRSA) и клиндамицину, ванкомицин-резистентность энтерококков и резистентность пневмококков к пенициллину и эритромицину [19]. Точность при определении чувствительности грибов превышала 98% в сравнении с референсным методом разведений. Время, затраченное на определение чувствительности бактерий, составляло в среднем 11 часов, а грибов – 12–14 часов [16, 19, 20].

Сокращение сроков исследования особенно важно при диагностике критических состояний. Показано, что непосредственный пересев материала из флакона Vact/ALERT с положительным результатом на карты VITEK 2 позволяет сократить время получения результата идентификации и определения чувствительности возбудителя до суток [21]. Важно, что ускорение с использованием VITEK 2 идентификации возбудителя и его чувствительности к антибиотикам приводит к уменьшению сроков госпитализации, снижению летальности и сокращает затраты на лечение более, чем на 25% [22].

Анализаторы серии VITEK 2 рассчитаны на единовременную загрузку от 30 до 120 карт в зависимости от модели. Карты позволяют изолированно проводить идентификацию и определение чувствительности.

Одним из наиболее современных методов идентификации бактерий является масс-спектрометрия. Технология MALDI-TOF (матричная лазерная десорбционная

времяпролетная масс-спектрометрия) основана на возможности разделения ионизированных под действием лазера частиц (крупных биомолекул) по времени пролета ими определенного расстояния в вакуумном пространстве масс-спектрометра. На основе анализа спектра частиц белков микробной клетки происходит видовая идентификация микроорганизма.

Данный принцип реализован в приборе VITEK MS, который состоит из собственно масс-спектрометра, станции пробоподготовки и специального русифицированного программного обеспечения MYLA, отвечающего за интерпретацию и представление данных, а также обеспечивающего связь и возможность управления несколькими приборами, участвующими в получении результата исследования. Анализатор VITEK MS сертифицирован в соответствии с Директивой 98/79/ЕС (IVDD), что официально разрешает использовать его для проведения исследований в клинических лабораториях.

VITEK MS позволяет осуществлять идентификацию микроорганизмов (практически всех видов встречающихся в клинической практике бактерий и грибов) за считанные минуты, он отличается высокой производительностью, дорогостоящий расходный материал не требуется. Точность идентификации микроорганизмов, выделенных в чистой культуре из клинических образцов, приближается к 100% [23, 24]. Корректная идентификация отмечена не только для часто встречающихся бактерий, но и для грибов, включая плесневые, анаэробных бактерий и микроорганизмов, определить видовую принадлежность которых традиционными методами не всегда легко [25, 26, 27]. При этом использование масс-спектрометра имеет ощутимые преимущества во времени, даже при работе с чистой культурой микроорганизмов. Существует потенциальная возможность использования прибора для идентификации возбудителей непосредственно в биологическом материале, в частности при диагностике инфекций кровотока [28].

Отличительная черта применения масс-спектрометра – высокая экономичность исследований, связанная с минимальным количеством используемых расходных материалов. Для работы с VITEK MS используется матричный раствор и слайды разового или многократного применения, каждый из которых рассчитан на возможность идентификации 48 микроорганизмов. Разовые слайды снабжены штрих-кодами, что гарантирует отсутствие ошибок при постановке и полную прослеживаемость анализа в программе MYLA. Одновременно в прибор можно загрузить до 4 слайдов, что позволяет исследовать до 192 микробных культур.

VITEK MS технологически (с помощью программного обеспечения MYLA) обеспечивает возможность совместного использования с анализатором VITEK 2, позволяющим

определять чувствительность микроорганизмов к противомикробным препаратам. Это делает исследование гораздо более информативным и обеспечивает получение полноценного результата (идентификация плюс чувствительность к антибиотикам), служащего основой для назначения целенаправленной антиинфекционной терапии.

Вышеописанное оборудование позволяет полностью автоматизировать процесс исследования в микробиологии от момента посева первичного материала до момента выдачи результатов чувствительности выделенного возбудителя к противомикробным препаратам. Приборы bioMerieux могут быть связаны единой программой MYLA, существенно расширяющей возможности управления, а также подключены к лабораторной информационной системе. Программное обеспечение анализаторов регулярно обновляется с учетом

изменений в номенклатуре микроорганизмов, появления новых антибиотиков и стандартов интерпретации чувствительности к ним, а также новых технических решений, позволяющих получать лучшие результаты диагностики. Возможность удаленного доступа к MYLA через программу VILINK дает возможность производить данные обновления, а также решать возникающие проблемы дистанционно.

Таким образом, решение предлагаемое в рамках концепции полной автоматизации микробиологической лаборатории, позволяет рационально распорядиться кадровым потенциалом и площадями лаборатории, обеспечивает безопасность сотрудников при работе с инфекционным материалом, ускоряет сроки получения и повышает качество диагностического результата, принося в итоге экономическую выгоду.*

* Список литературы находится в редакции