

*Преаналитический этап
микробиологической
диагностики*

Методы микробиологической диагностики

1. Микроскопический
 2. Микробиологический (бактериологический и вирусологический) – выделение чистой культуры и ее идентификация.
 3. Иммунологический (серологический, аллергологический) – используется для выявления **антигенов** возбудителя или **антител** к ним.
 4. Молекулярно– генетический – ДНК– и РНК– зонды, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и многие другие.
- 

Классическая микробиология

- ▶ Выделение чистой культуры
- Идентификация
- Определение чувствительности к АМП
- ▶ Детекция АГ (РИФ, ИФА)
- ▶ Детекция генов (ПЦР)
- ▶ Детекция АТ (серологические реакции, ИФА)

«Новая» микробиология

- ▶ Выделение чистой культуры
- Идентификация автоматизированная или MS
- Автоматизированное определение чувствительности к АМП
- ▶ Детекция генов 16s рРНК
- ▶ Детекция генов резистентности

Современная микробиология

- ▶ Культуральные методы с применением хромогенных сред, автоматизированной идентификацией возбудителя и автоматизированным определением чувствительности к АМП
- ▶ Методы, основанные на идентификации генома возбудителя (ПЦР, детекция генов 16s рРНК, детекция генов резистентности)
- ▶ Полногеномное секвенирование

Культуромика

Метагеномика

Современная микробиология

Все методы диагностики делятся на 3 этапа:

- ▶ Преаналитический
- ▶ Аналитический
- ▶ Постаналитический

Характеристика бактериологического метода диагностики

- ▶ Бактериологический метод диагностики основан на выделении чистой культуры бактерий и идентификации ее по свойствам в лабораторных условиях.

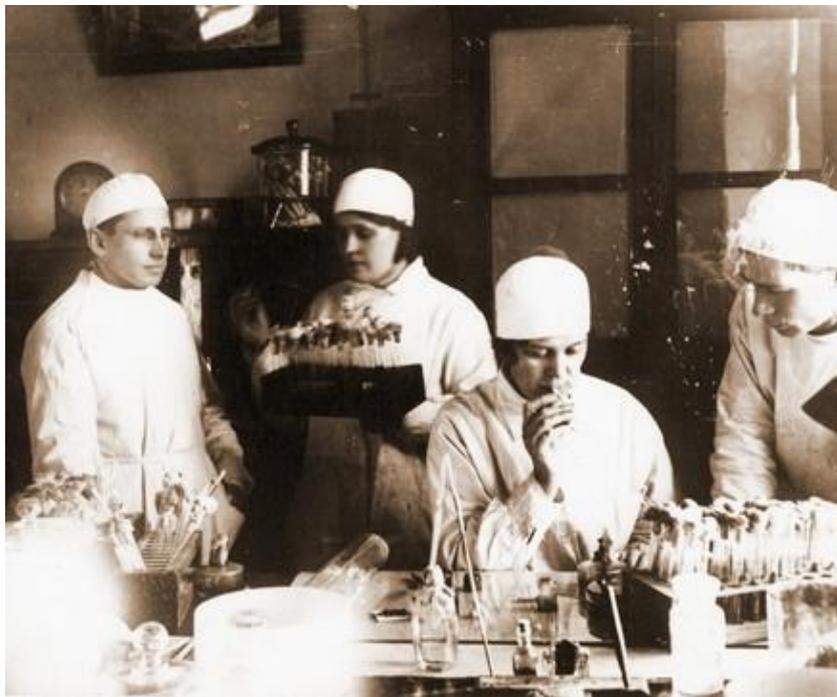
Чистая культура – популяция одного вида микроорганизмов, выделенная на ПС.

Идентификация – установление видовой принадлежности микроорганизма.

С этой целью определяют морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические и антигенные свойства.

Грядущие поколения, конечно, продолжат дело Пастера,
но как бы далеко они не зашли,
они все равно будут следовать по проложенному им пути
К.А. Тимирязев

Микробиология вчера и сегодня ...



Ручной посев

Более 100 лет

Ручной посев



Золотой стандарт

ограничения метода

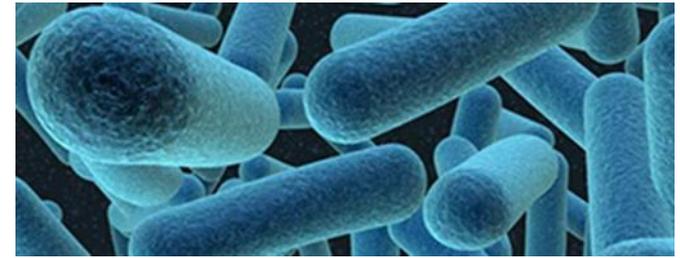
На преаналитическом этапе

- ▶ Плохо собранный материал
 - ▶ Сроки доставки
- ▶ Условия транспортировки
 - ▶ Человеческий фактор

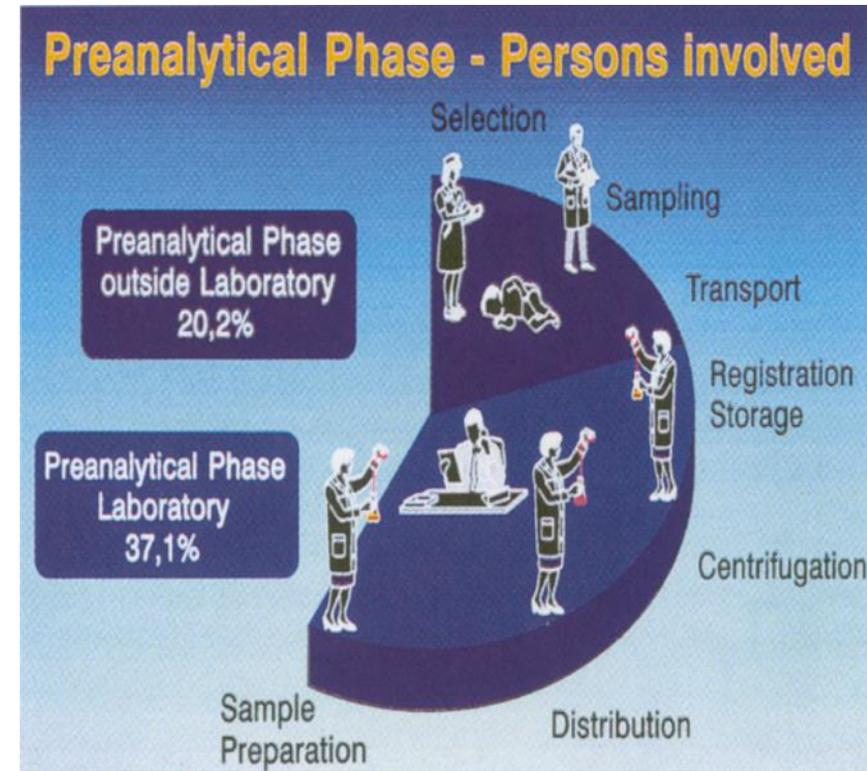
На аналитическом этапе

Человеческий фактор
Качество питательных сред,
Диагностических наборов
И т.п.

Этапы преаналитики в микробиологии



- ▶ Формулировка задачи и цели исследования, оформление направления (клиницисты)
- ▶ Сбор биоматериала и транспортировка биоматериала (средний медперсонал)
- ▶ Прием, регистрация, обработка и первичный посев биоматериала (лаборанты – микробиологи)



Формулировка задачи и цели исследования (клиницисты)

МинЗдрав РФ Код формы по ОКД
Код учреждения по ОКТО
Наименование учреждения Медицинская документация форма № 200у
Утв. Минздравом 04.10.00 № 1032

НАПРАВЛЕНИЕ НА АНАЛИЗ № _____
" " 200 г.
дата взятия биоматериала

В лабораторию _____
Фамилия, и. о. _____
Возраст _____
Учреждение _____ отделение _____
палата _____ участок _____ медицинская карта № _____
Диагноз, группа диспансерного учета _____
Исследовать (указать консервант) _____ (нужное вписать)

Подпись врача: _____

- ▶ Врач–основной заказчик и пользователь лабораторных исследований
- ▶ Формулировка задач и целей исследования – **НАПРАВЛЕНИЕ**

Содержание направления

- ▶ Ф.И.О., возраст, пол
- ▶ Адрес
- ▶ Дата и время назначения исследования
- ▶ Вид исследуемого материала
- ▶ Предполагаемый диагноз
- ▶ Ф.И.О. лечащего врача
- ▶ Дата и время взятия биологического материала (Соответствие времени назначения исследований динамике патологического процесса)
- ▶ Дата и время поступления материала в лабораторию
- ▶ ФИО выполнившего процедуру сбора

Что необходимо учитывать?

МИНЗДРАВ РФ
Код формы по ОКЗД
Код учреждения по ОКТО
Наименование учреждения
Медицинская документация форма № 200у
Утв. Минздравом 04.10.82 № 1032

НАПРАВЛЕНИЕ НА АНАЛИЗ № _____
" " _____ 200 г.
дата взятия биоматериала

В лабораторию _____
Фамилия, и. о. _____
Возраст _____
Учреждение _____ отделение _____
палата _____ участок _____ медицинская карта № _____
Диагноз, группа диспансерного учета _____
Исследовать (указать консервант) _____ (нужное вписать) _____
Подпись врача _____

ВАЖНО!

- ▶ Влияние лекарственных препаратов на результат исследования
- ▶ Диагностическую чувствительность и специфичность метода

- ▶ Взять материал в оптимальные сроки заболевания
- ▶ Произвести забор материала с учетом места максимальной локализации возбудителя в соответствии с путями его выделения в окружающую среду
- ▶ Провести манипуляции до применения антибиотиков и других химиотерапевтических препаратов или после отмены антибиотиков через 2—3 дня (На фоне антибактериальной терапии – перед очередным приемом (введением) антимикробных препаратов)

Ошибки преаналитического этапа



На уровне забора материала

- ▶ Неправильная подготовка больного
- ▶ Как правило, забор материала производит не врач, а персонал не обучается правильному забору, поэтому не соблюдаются меры индивидуальной защиты (инфицирование персонала, контаминация материала)
- ▶ Пациенты проводят сбор биоматериала самостоятельно, но при этом не информируются о правилах сбора
- ▶ Для взятия материала используются неспециализированные транспортные емкости

На уровне транспортировки

1. температурный режим во время транспортировки
2. время доставки
3. правила упаковки и укладки ПБ

Сбор и транспортировка

МИНЗДРАВ РФ
Код формы по ОКД
Код учреждения по ОКТО
Наименование учреждения
Медицинская документация форма № 200у
Утв. Минздравом 04.10.89 № 1032

НАПРАВЛЕНИЕ НА АНАЛИЗ № _____
" " _____ 200 г.
дата взятия биоматериала

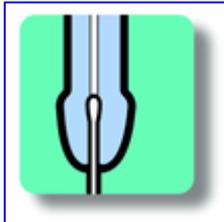
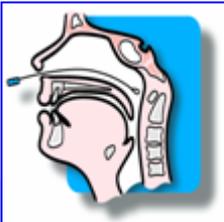
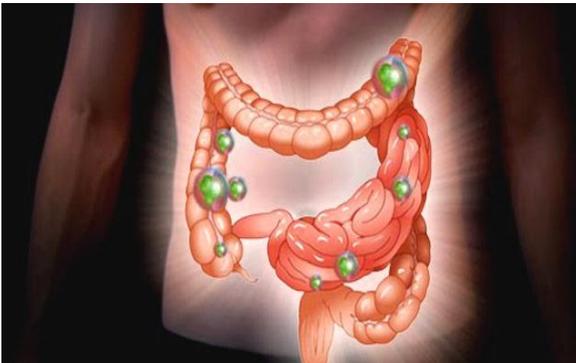
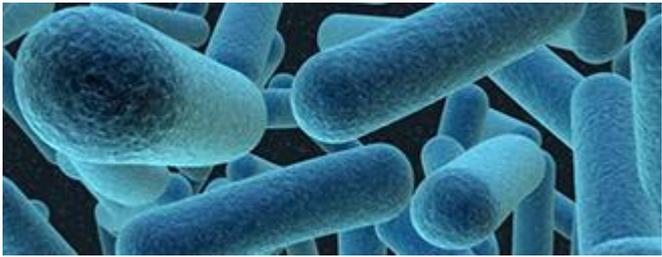
В лабораторию _____
Фамилия, и. о. _____
Возраст _____
Учреждение _____ отделение _____
палата _____ участок _____ медицинская карта № _____
Диагноз, группа диспансерного учета _____
Исследовать (указать консервант) _____ (нужное вписать)

Подпись врача: _____

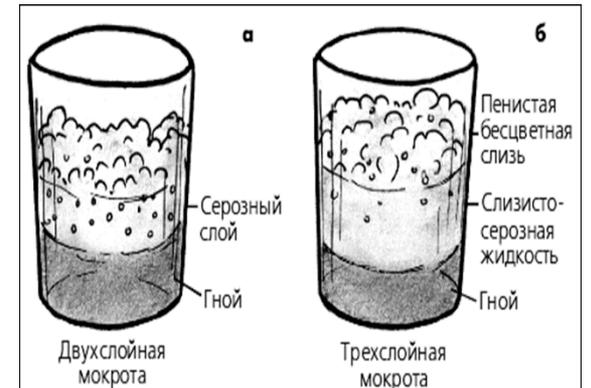
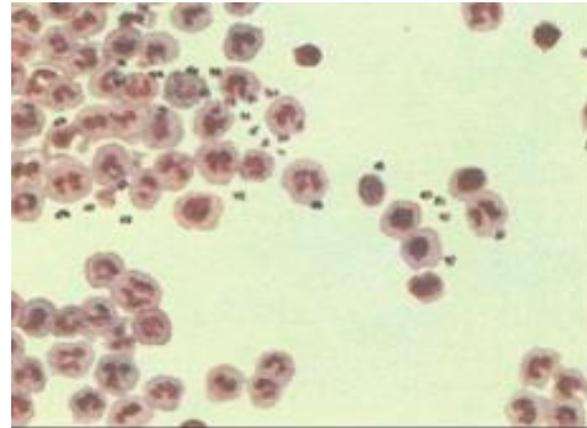
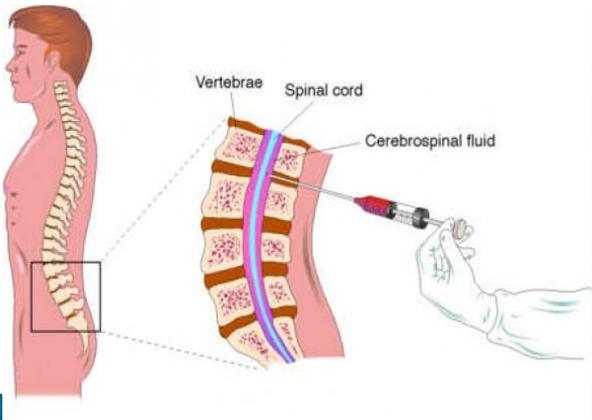
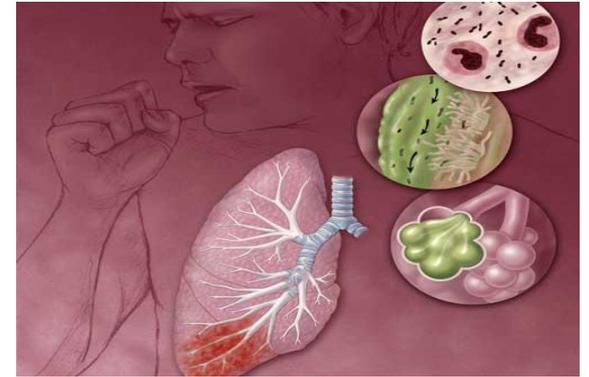
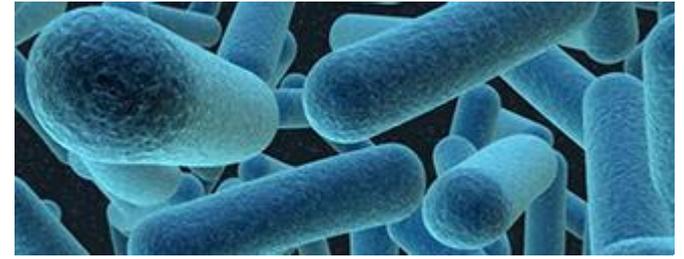
ВАЖНО!

- ▶ Clinical Microbiology Procedure Handbook (Editor Henry D.Isenberg, Third Edition)
- ▶ Приказ МЗ СССР № 535 от 22.04.85 г. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений»
- ▶ Приказ МЗ и МП РФ № 8 от 19.01.95 г «О развитии и совершенствовании деятельности лабораторий микробиологии (бактериологии) лечебно-профилактических учреждений»
- ▶ Методические указания МУ 4.2.2039-05 от 01.07.06 г. «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории»
- ▶ Количество материала должно быть достаточным для проведения исследования
- ▶ Условия взятия и транспортировки должны исключать контаминацию посторонней микрофлорой
- ▶ Необходимо использовать специализированные контейнеры или транспортные системы

Виды биологического материала



Виды биологического материала



Критерии отбраковки образцов



Критерий	Действия
Канцелярский: <ul style="list-style-type: none">– Несоответствие данных о пациенте данным на контейнере с образцом– Образцы не подписаны	Уведомить персонал. Запросить новый образец
Общий микробиологический: <ul style="list-style-type: none">– Катетер Фоля– Образец мочи хранился в холодильнике 24 ч– Контейнер протекает– Сухой тампон– 1 тампон на много исследований	Катетер Фоля не подвергается микробиологическому исследованию. Уведомить персонал, объяснить причину отказа, запросить новый образец
Анаэробы <ul style="list-style-type: none">– Материал доставлен в несоответствующем контейнере	
Аэробы <ul style="list-style-type: none">– Мокрота с < 25 WBC, > 10 эпит.клеток в поле зрения	Уведомить персонал, что мокрота содержит много слюны, не подходит для микробиолог. Исследования, запросить новый образец
Для исследования на гонорею взят материал из цервикса, вагины и анальных крипт	Уведомить персонал, что эти анатомические области могут содержать негонококковые нейссерии

Эволюция систем для взятия биоматериала



Эволюция систем для взятия биоматериала

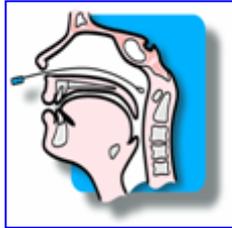


Транспортная среда	назначение
Среда Амиеса Среда Стюарта	Большинство аэробных и факультативно анаэробных бактерий
Среда Амиеса с углем	Для транспортировки прихотливых микроорганизмов
Среда Кэри Блейра	Для транспортировки образцов, содержащих энтеробактерии (сальмонеллы, шигеллы, иерсинии, кампилобактерии, вибрионы, и др.
Среда для транспортировки облигатных внутриклеточных паразитов	Содержит сыворотку КРС, а/к, витамины для поддержания жизнедеятельности культур клеток

Транспортные среды для широкого спектра бактерий

LIQUID AMIES MEDIUM	LIQUID Stuart MEDIUM
Sodium Chloride 3.0g Potassium Chloride 0.2g Calcium Chloride 0.1g Magnesium Chloride 0.1g Monopotassium Phosphate 0.2g Disodium Phosphate 1.15g Sodium Thioglycollate 1.0g Distilled Water 1 litre	Sodium Glycerophosphate 10.0g Calcium Chloride 0.1g Mercaptoacetic Acid 1.0ml Distilled Water 1 litre

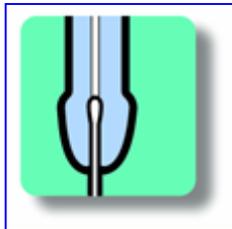
Виды аппликаторов



Витой проволочный аппликатор



Пластиковый аппликатор



Алюминиевый аппликатор



Бумажный аппликатор



Алюминиевый аппликатор

- ▶ **СОРАН** выпускает 3 вида алюминиевых аппликатора:
- ▶ стандартный (вместо пластикового аппликатора) для взятие проб из ушей, глаз, носа и уретры у мужчин. Этот аппликатор имеет небольшой диаметр, поэтому используется для взятия материала из узких участков.
- ▶ Мягкий алюминиевый аппликатор, который легко изгибается и поэтому ему можно придать необходимый изгиб для забора материала из труднодоступных участков. Поэтому этот вариант аппликатора удобен для применения в педиатрии.
- ▶ Витой проволочный – созданный специально для взятия проб из носовых ходов, задней стенки глотки и др., будучи очень эластичным и гибким.



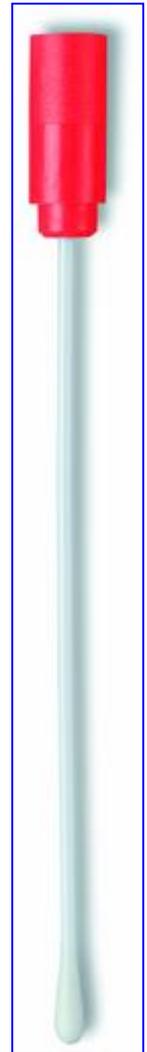
Традиционный деревянный аппликатор



- ▶ С ватным тампоном. Можно использовать только в случае работы с неприхотливыми микроорганизмами. На рисунке слева видно, что после совместной инкубации бактериальной культуры и деревянного аппликатора с хлопковым тампоном на чашке с питательной средой вокруг последнего образуется т.н. «зона задержки роста». На правом рисунке в аналогичном опыте с пластиковым аппликатором и вязким тампоном подобного явления обнаружено.
- ▶ Данный эффект обусловлен наличием *жирных кислот* и других *ингибирующих веществ*, которые содержатся в хлопке и дереве. Именно они вызывают *бактериостатический эффект* традиционных материалов.
- ▶ В связи с этим производство подобных аппликаторов фирма постепенно уменьшает.

Пластиковый аппликатор

- ▶ Подходит для взятия проб из уха, зева, раны, а также генитальных, ректальных и других проб.
- ▶ пластиковые аппликаторы являются альтернативой стандартным алюминиевым аппликаторам. Особенно важно, что в научной литературе есть сообщения о влиянии ионов металла алюминиевых аппликаторов на результаты ПЦР-анализа.
- ▶ Эта возможная проблема может быть успешно решена благодаря подобным пластиковым аппликаторам.

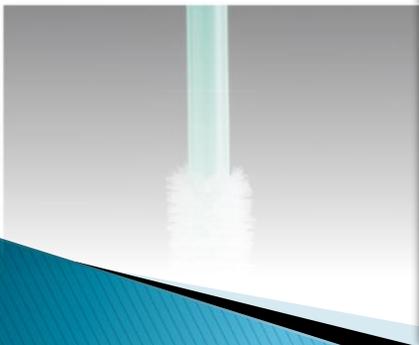


Варианты тампонов

- ▶ **Вискоза** (дериват целлюлозы). Это лучший материал для микробиологических исследований, так как не содержит веществ, убивающих микроорганизмы и, следовательно, для них нетоксичен.
- ▶ **Полиэстер** (т.н. дакрон) – искусственное волокно. Не так хорош, как вискоза, однако в некоторых случаях, он будет более предпочтителен, например, для взятия образцов, предназначенных для проведения молекулярных биологических исследований. Последний не интерферирует с ДНК в процессе анализа, что происходит с вискозой.

Новое поколение тампонов для взятия клинического материала

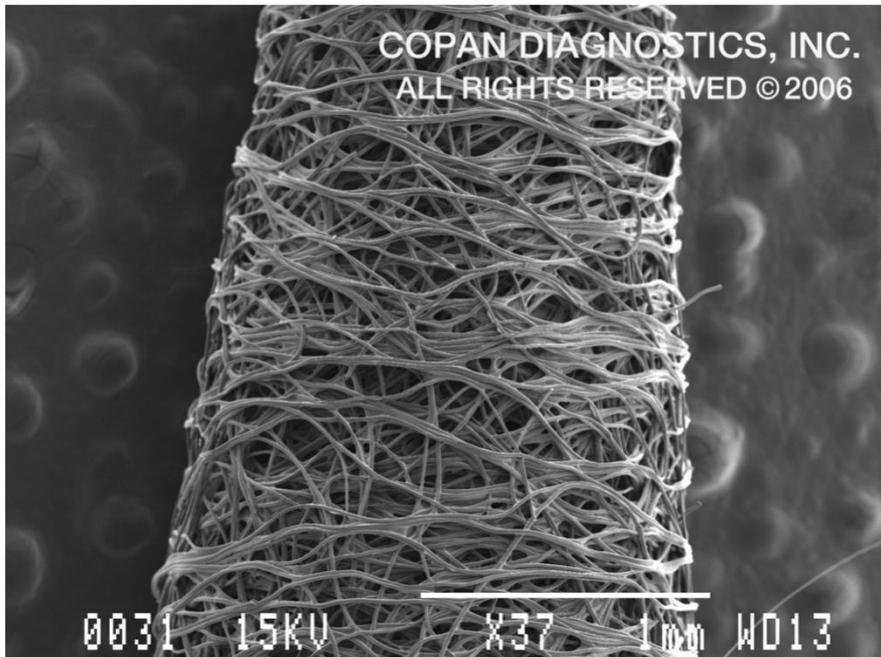
FLOQSwabs™
by COPAN



- ▶ *Эргономичный и анатомический дизайн*
- ▶ *Усовершенствованная техника сбора образцов*
- ▶ *Быстрая, спонтанная и полная десорбция*
- ▶ *Эксклюзивная технология производства и уникальные преимущества*

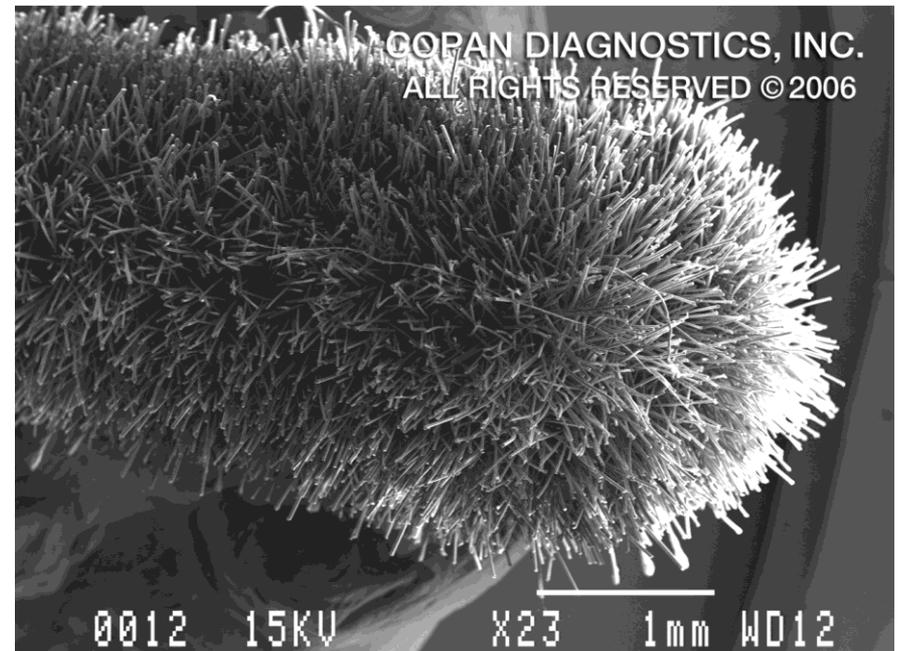
Новое поколение тампонов для взятия клинического материала

Electron Microscope photograph of traditional fiber winded swab.



2 km of micro-fibre (rayon)

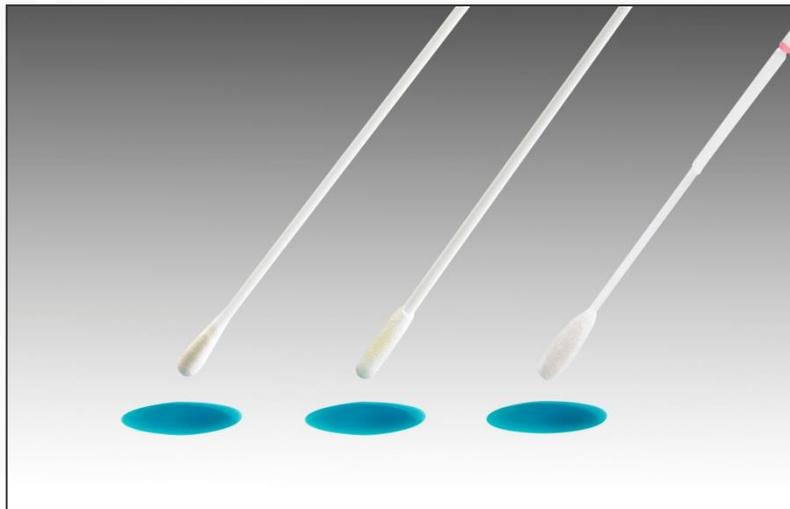
Electron Microscope photograph of a nylon flocked swab.



FLOQSwabs™ by COPAN



Volume of liquid **absorption** with Flocked Swabs is higher and faster than traditional swabs.



Example:
Flocked Mini-tip absorbs 55 μ l in 5 seconds
versus an old-style mini-tip, which
absorbs only 25 μ l.

90% собранного велюр-тампоном материала поступает в жидкую среду

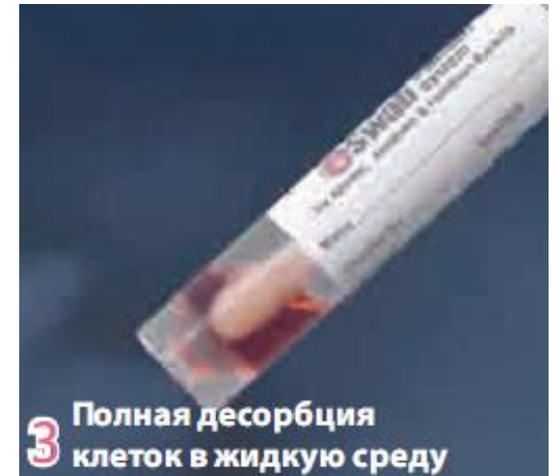
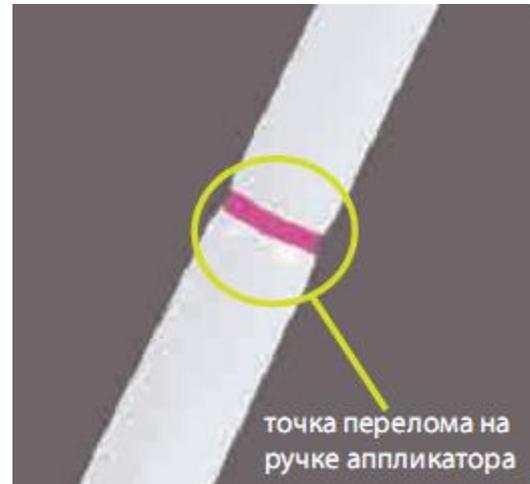


Традиционный тампон

Велюр-тампон

eSwab

Универсальная система для сбора, транспортировки и поддержания жизнедеятельности аэробных, анаэробных и прихотливых микроорганизмов, сохранения их нуклеиновых кислот и антигенов



Жидкостная микробиология – новая технология преаналитического этапа

- ▶ В транспортной среде создаются оптимальные условия доставки, сохранности и транспортировки материала в лабораторию
- ▶ Микроорганизмы сохраняют жизнеспособность до 72 часов
- ▶ Весь материал, собранный вельюр–тампоном, попадает в жидкую среду
- ▶ Можно использовать для посева и других методов диагностики (микроскопия, ПЦР, РИФ и др.)

РЕШЕНИЕ

Концепция жидких транспортных сред – основа стандартизации и автоматизации микробиологического процесса



Среда обогащения для
выделения Salmonella

seleniteBroth

- **Специально предназначена для выделения Сальмонелл**
Селенит натрия подавляет рост и размножение других представителей кишечной микрофлоры.
- **Готова к применению**
Длительный срок хранения и стабильность раствора при комнатной температуре. Небьющаяся пробирка.
- **Предназначена для образцов фекалий, либо образцов, взятых тампоном**



Кат. №	Описание	Упаковка
475CE	Пробирка 12 x 80мм с завинчивающейся крышкой, заполненная 2 мл селенитового бульона	50 штук в упаковке; 6 x 50 штук в коробке



- **Среда обогащения для MRSA**
Специально предназначена для накопления MRSA с целью последующего культивирования на селективных питательных средах.
- **Готова к применению**
Длительный срок хранения и стабильность раствора при комнатной температуре. Маленькая пластиковая пробирка надежна и легка в транспортировке.
- **Различные варианты комплектации**
Для работы в лаборатории можно заказать пробирки со средой без тампонов или с тампоном. При необходимости можно сделать комплектацию набора по заказу.

Кат. №	Описание	Упаковка
477CE	Пробирка 12 x 80мм с завинчивающейся крышкой, заполненная 2 мл TSB бульона с 2,5% NaCl	50 штук в упаковке; 6 x 50 штук в коробке
477CE03	Пробирка 12 x 80 мм с завинчивающейся крышкой, заполненная 2 мл TSB бульона с 2,5% NaCl, укомплектованная 3 универсальными велюр-тампоном	50 штук в упаковке; 6 x 50 штук в коробке

limBroth

Среда обогащения для выделения Streptococcus Group B



- **Селективная среда обогащения для Streptococcus Group B**
Эта среда является модификацией жидкой среды Todd Hewitt. Входящие в ее состав антибиотики подавляют рост сопутствующей бактериальной флоры и не оказывают влияния на выживаемость Streptococcus agalacticae (GBS).
- **Готова к применению**
Длительный срок хранения и стабильность раствора при комнатной температуре. Маленькая пластиковая пробирка надежна и легка в транспортировке.
- **Различные варианты комплектации**
Для работы в лаборатории можно заказать пробирки со средой без тампонов или с тампоном. При необходимости можно сделать комплектацию набора по заказу.

Кат. №	Описание	Упаковка
476CE	Пробирка 12 x 80 мм с завинчивающейся крышкой, заполненная 2 мл limBroth	50 штук в упаковке; 6 x 50 штук в коробке
476CE01	Пробирка 12 x 80 мм с завинчивающейся крышкой, заполненная 2 мл limBroth, укомплектованная 1 универсальным велюр-тампоном	50 штук в упаковке; 6 x 50 штук в коробке

Для автоматизированного бактериологического посева точка перелома у велюр-тампона должна соответствовать высоте пробирки - 80 мм

Journal of
Clinical Microbiology

Evaluation of Optimal Storage Temperature, Time, and Transport Medium for Detection of Group B Streptococcus in StrepB Carrot Broth

Ashton Trotman-Grant, Trisha Raney and Jennifer Dien Bard

J. Clin. Microbiol. 2012, 50(7):2446. DOI: 10.1128/JCM.00238-12.

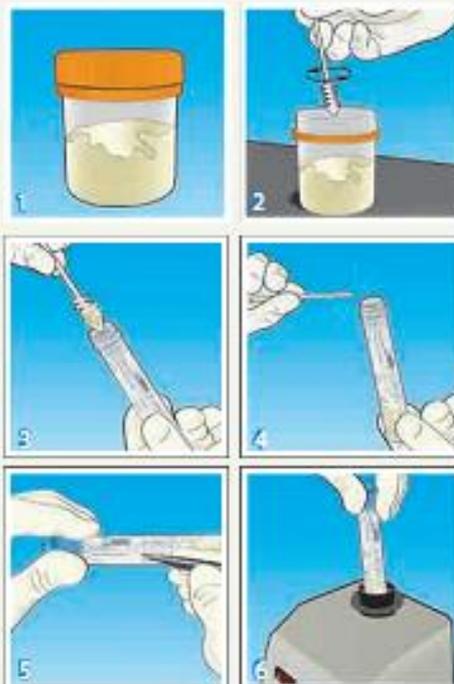
Published Ahead of Print 18 April 2012.

Удобная, готовая к применению система для разжижения образцов мокроты

SLsolution



- **Готова к применению**
Стерильная пластиковая пробирка, содержащая муколитический агент Дитиотреитол (ДТТ). Предварительное увлажнение образца не требуется.
- **Чрезвычайно практична**
С помощью специального устройства (диппера) определенное количество образца мокроты переносится в пробирку с ДТТ и смешивается на вортексе: теперь образец мокроты разжижен и может быть засеян на чашки ручным или автоматизированным способом.
- **Дополнительные преимущества**
Система SLSolution стабильна при комнатной температуре и имеет длительный срок хранения благодаря уникальной упаковке.



SLsolution

Набор с устройством для переноса мокроты

1. Возьмите стерильный диппер (устройство для переноса мокроты)
2. Опустите диппер в контейнер с предварительно собранной мокротой. Объем собранной мокроты от 300 мкл до 1 мл не влияет на конечные результаты исследования
3. Возьмите индивидуальную упаковку, сдерживая пробирку с SLsolution; откройте пробирку крышкой
4. С помощью диппера перенесите образец мокроты в пробирку, содержащую ДТТ, ручку диппера отложите в точна параллелью
5. Закройте пробирку
6. В течение 30 секунд омешивайте содержимое пробирки на вортексе при 2000/2500 об/мин. до полного разжижения мокроты. Оставьте пробирку при комнатной температуре на 15 минут. Увеличение времени контакта образца с реактивом до 6 часов не оказывает влияния на жизнеспособность бактерий и грибов в исследуемом образце.
7. Соблюдая асептическую технику, осуществите посев и микроскопию образца.



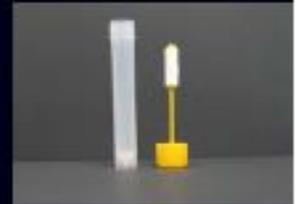
Copan UriSWAB™



**The Ultimate Solution
for Urine
Collection & Transport**



UriSWAB product format



THE SPONGE (1)



**SUPER Hydrophilic
Foam Sponge**

Quick absorption

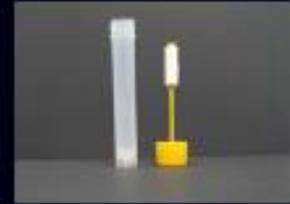
2 ml



Foam Sponge incorporates Stabilizers



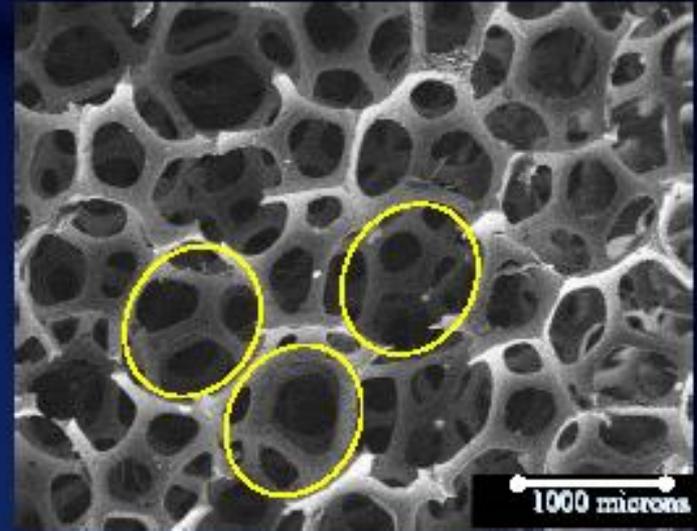
UriSWAB product format



THE SPONGE (2)

Stabilizers: **Boric acid & Sodium formate**
(No mercury compounds)

Stabilizers FOAMED with polymers
during polyurethane sponge
production



Multiple and uniformly spread bacterio-static sites

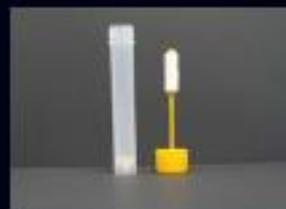


Stabilizers homogeneously interact with sample



UriSWAB - How to Use (2)

In the Lab



Squeeze Tube to release
sample to tube bottom



Unscrew Cap and remove the
Sponge device

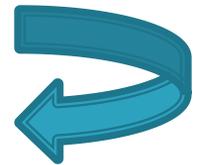


Take desired amount of
Sample to be processed
for the Analysis

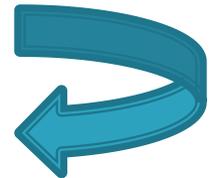
Жидкостная микробиология – новая технология преаналитического этапа

Преимущества:

Любые образцы, в т.ч. биоптаты
Транспортировка и сохранность
Эффективность исследования



Стандартизация
Ручной посев и Автоматизация



Процедура обработки образцов на преаналитическом этапе



Требование:	<ol style="list-style-type: none">1. Образцы должны быть правильно промаркированы2. Информация на образце и в направлении должна совпадать3. Образец должен быть правильно собран (соответствующий контейнер)4. Образец должен соответствовать запрашиваемому тесту
Питательные среды для выделения аэробных культур	<ul style="list-style-type: none">- Кровяной агар с эритроцитами Барана 5%- Шоколадный агар- Mitis salivarius агар- Мак Конки агар- Энтерококк. Агар- Питательный бульон
Для выделения мочевых культур	<ul style="list-style-type: none">- Кровяной агар с эритроцитами Барана 5%- Мак Конки агар или с эозином и метиленовым синим- Энтерококк. Агар
Для фекальных образцов	<ul style="list-style-type: none">- кампиАгар- МакКонки или ЭМС- Гектеновый агар- Грам негатив. бульон
Анаэробы	<ul style="list-style-type: none">- Бруцелла агар- Бактероид Желчь-эскулин агар- Тиогликолевая среда
Генитальные образцы	<ul style="list-style-type: none">- Кровяной агар с эритроцитами Барана 5%- Шоколадный агар- Мак Конки агар или с эозином и метиленовым синим

Микробиология сегодня ... Что завтра?...

Требуется решение



Ручной труд



Полностью автоматизи-
рованная баклаборатория

Как осуществить переход?

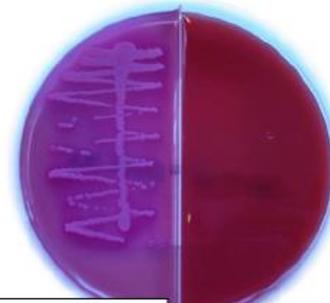
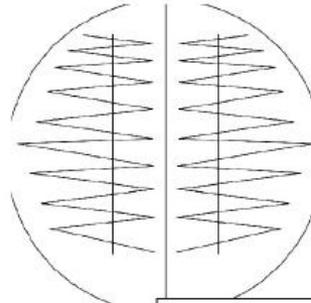
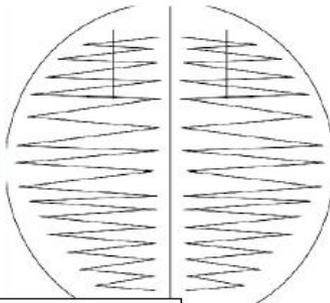
Стандартизация бактериологического посева



Стандартизация бактериологического посева

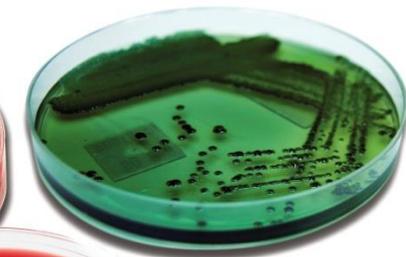
Классический образец посева

Vertical Biplate Type 1 :



Prélèvement 1103-65425 (pas repris dans les tests) / Escherichia coli >100.000 germes/mL

Prélèvement 1103-65425 (pas repris dans les tests) / Escherichia coli >100.000 germes/mL



Благодарю за внимание!

