



Микробиологические методы исследования в практике лечения COVID-19

Кильчевская Татьяна
Старший специалист по продукции
ТОО «НПФ «Медилэнд»

Клинический протокол

Одобен
Объединенной комиссией
по качеству медицинских услуг
Министерства здравоохранения
Республики Казахстан
от «04» июля 2020 года
Протокол №104

КЛИНИЧЕСКИЙ ПРОТОКОЛ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ

КОРОНАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ COVID-19

1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ:

1.1 Код(ы) МКБ-10:

Код	МКБ-10
U07.1	Коронавирусная инфекция COVID-19 (Вирус идентифицирован)
U07.2	Коронавирусная инфекция COVID-19 (Вирус не идентифицирован) для провизорных стационаров

- **посев крови на стерильность и гемокультуру (при подозрении на сепсис);**
- **посев мокроты при подозрении на бактериальную этиологию пневмонии;**

ФЛАКОНЫ ДЛЯ ПОСЕВА КРОВИ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ И ГЕМОКУЛЬТУРУ



- Одноразовые флаконы промышленного производства
- Готовая питательная среда (аэробные, анаэробные, педиатрические)
- Ударопрочный поликарбонатный флакон – безопасность транспортировки
- Определение стерильности **в течение 1 суток** (традиционным методом – 10 суток)



- В составе адсорбирующие полимерные гранулы для нейтрализации антибиотиков.
- Не требуется отменять назначенную антибиотикотерапию перед взятием образца
- Улучшается высеваемость микроорганизмов у пациентов, принимающих антибиотикотерапию
- В дно флакона встроен колориметрический датчик
- Он отслеживает наличие и выработку углекислого газа (CO_2), продуцируемого микроорганизмами
- При появлении CO_2 цвет газопроницаемого датчика изменяется с сине-зеленого на желтый.

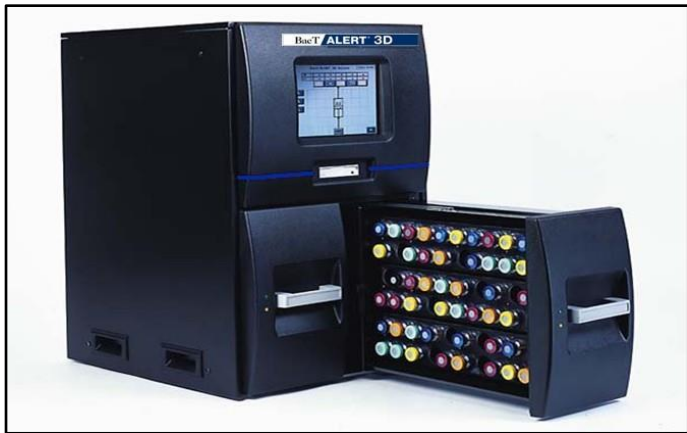




Количество исследований 0-3 в день (до 1200 исследований в год) – предлагаем флаконы

Количество исследований более 3 в день (от 1200 исследований в год) – предлагаем анализатор, в том числе на безвозмездное пользование

Автоматический анализатор BacT /ALERT 3D (BioMérieux, США)



- 120 флаконов на борту одновременно в любом ассортименте (аэробные, анаэробные, педиатрические)
- Автоматическое отслеживание и уведомление о появлении нестерильных флаконов
- Результаты каждого считывания каждого флакона сохраняются и анализируются компьютерной системой, при этом строится кривая микробного роста на основании алгоритмов, заложенных в программное обеспечение каждого прибора.

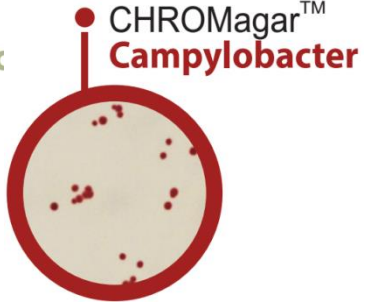
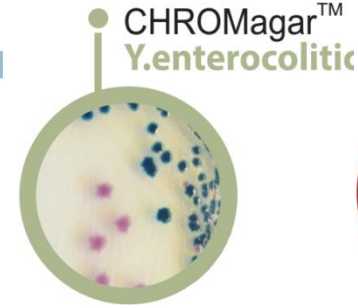
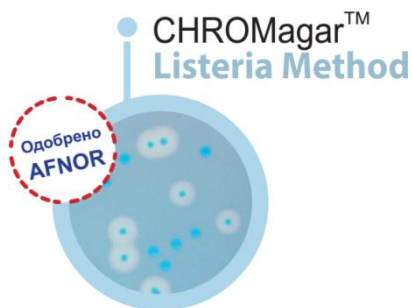
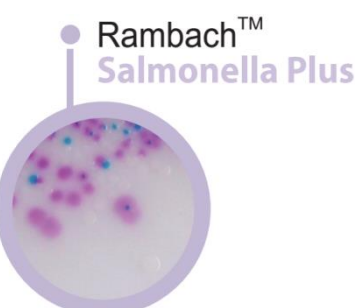
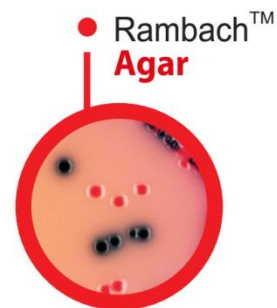
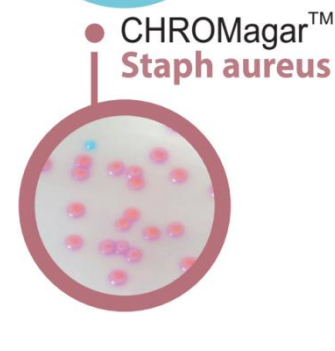
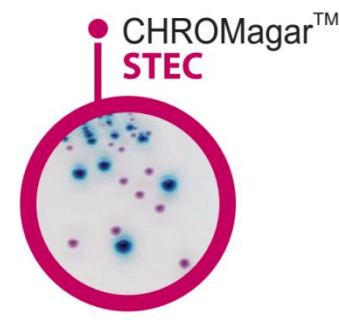
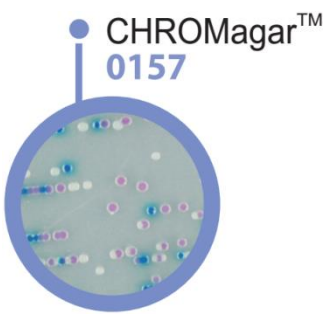
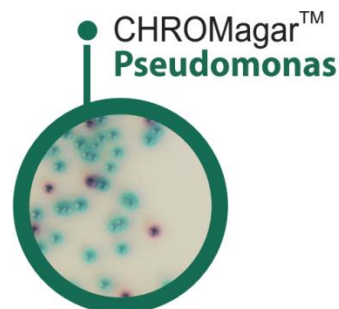
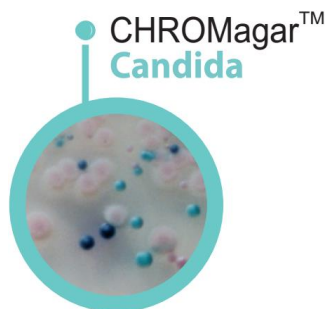
Быстрое обнаружения бактериемии и фунгемии в гемокультурах, а также в других стерильных жидкостях организма

Несколько часов вместо нескольких дней!

- 
- Вирусные инфекции дыхательных путей часто осложняются сопутствующими бактериальными инфекциями, это может иметь место, в частности, при инфекциях, вызванных COVID-19.
 - Вторичные инфекции наблюдаются в реанимации (15% случаев и фактор ошибочного диагноза), а не до госпитализации.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

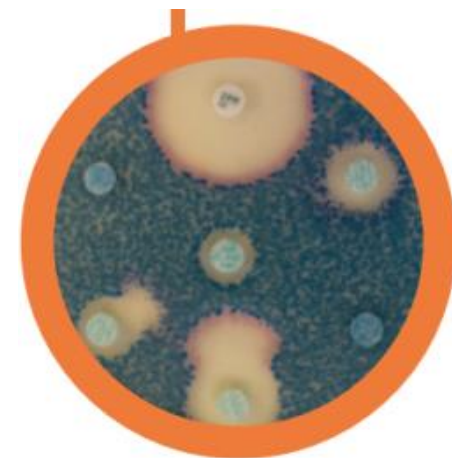
ХРОМОГЕННЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ПОДСЧЕТА ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ (CHROMagar, Франция)



КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Хромогенный агар Мюллера-Хинтона Chromagar MH Orientation

- Разработан для **ускоренного одновременного получения результатов** по идентификации микроорганизмов и определению их чувствительности к антибиотикам непосредственно в первичной культуре
- В отличие от традиционного протокола, который занимает 48 часов, для исследования достаточно 1-й ночной инкубации
- Этим методом можно легко исследовать как мультимикробные, так и мономикробные образцы.
- Идентификация микроорганизмов осуществляется по уникальному для каждого вида окрашиванию выросших колоний
- Чувствительность к антибиотикам – по зоне лизиса вокруг диска.
- Результаты идентификации и чувствительности, полученные быстро и одновременно, могут подтвердить эмпирическую терапию или помочь принять решение об ее изменении.
- ВИДЫ ОБРАЗЦОВ:
 - респираторные образцы пациентов с вентилятор-ассоциированной пневмонией (ВАР - одна из наиболее частых нозокомиальных инфекций с высоким уровнем инфицирования и смертности).
 - образцы мочи с типичным количеством инфекционных агентов 10^3 - 10^5 КОЕ/мл.
 - образцы крови из положительных флаконов на стерильность.



1 упаковка рассчитана на исследование 300 образцов.

Цена 1 исследования – 749 тенге

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Традиционный метод

1-е
сутки

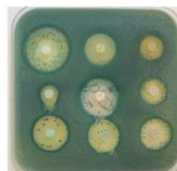


2-е
сутки



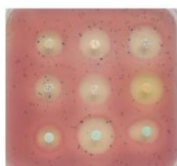
CHROMagar MH Orientation, РК-ИМН-5N№017028

1-е
сутки



Анализ инфекции мочевых
путей на CHROMagar MH
Orientation

→ *Klebsiella* + *Pseudomonas*



Анализ инфекции мочевых
путей на CHROMagar MH
Orientation

→ *E. coli* + *Enterococci*
(контаминация)



Антибиотикограмма¹

→ Микс грамотрицательных
бактерий



Антибиотикограмма¹
E. faecalis

после 8-часовой инкубации
на агаре Мюллера Хинтона



Антибиотикограмма¹
E. faecalis

после 8-часовой инкубации
на CHROMagar MH Orientation

2 в 1

Позволяет проводить хромогенную
идентификацию и чувствительность к
антибиотикам на одной чашке.

БЫСТРЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Для многих микроорганизмов /
антибиотиков результаты можно прочесть
сразу после инкубации **в течение ночи.**

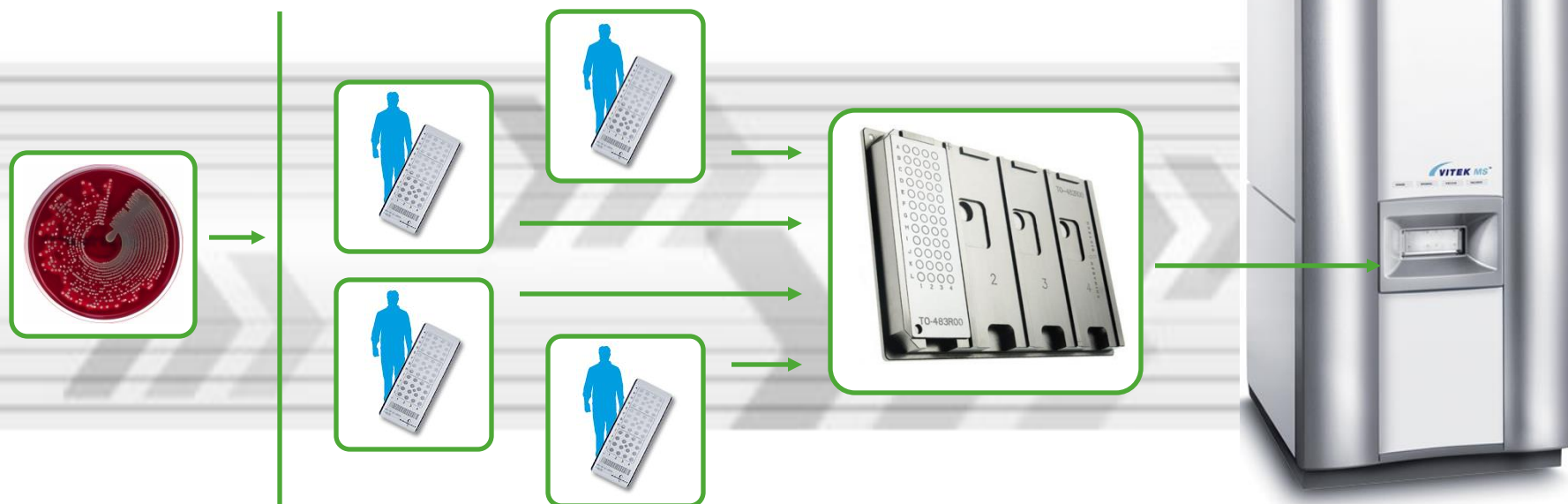
ЛЕГКОЕ СЧИТЫВАНИЕ ЧАШКИ

Благодаря хромогенным реакциям четко
определены диаметры и/или зоны
ингибирования.

Хромогенный агар Мюллера-Хинтона получил широкое применение при анализе образцов пациентов с вентилятор-ассоциированной пневмонией — основного осложнения при **COVID-19.**

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

MALDI-TOF (Матричная Лазерная Десорбционная Ионизация – времяпролетная МС) – разновидность массовой спектрометрии, с помощью которой можно проводить скрининг белков непосредственно на интактной бактерии



**Масс-спектрометр для идентификации микроорганизмов VITEK MS
(BioMérieux, Франция)**

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

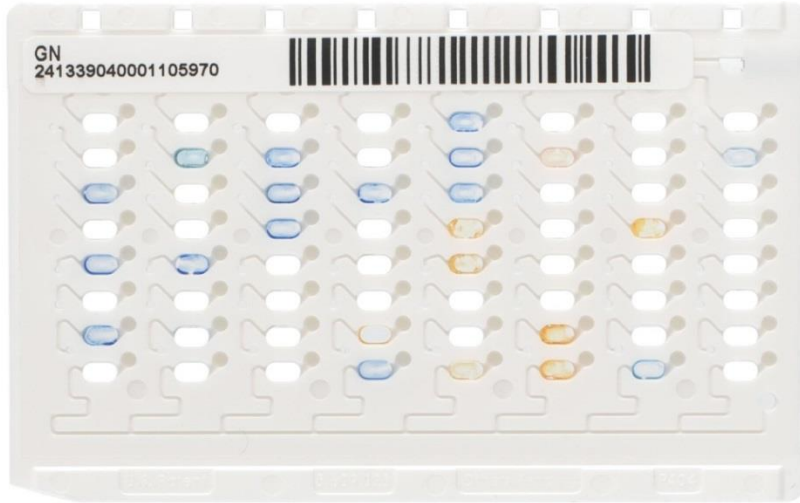
**Автоматический микробиологический анализатор Vitek 2
Compact фирмы BioMerieux (США), РК-МТ-5№020539**



**Идентификация и определение чувствительности в день
получения чистой культуры**

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Vitek 2 : карты



- 64 лунки с биохимическими субстратами или антибиотиками
- миниатюрный размер: 90x55x4 мм
- уникальный штрих-код
- герметичность
- **Результат в МИК! (важно для клинициста)**

ID-карты

Идентификация около **450** видов микроорганизмов

- Грамположительные бактерии
- Грамотрицательные бактерии
- Анаэробные микроорганизмы и виды рода *Corynebacterium*
- Аэробные спорообразующие палочки семейства *Bacillaceae*
- *Neisseria-Haemophilus* и другие прихотливые бактерии
- Грибы

AST-карты

• Чувствительность к **18-22** антибиотикам и обнаружение резистентности

- Грамположительные бактерии
- Грамотрицательные бактерии
- Грибы

МИКРОБИОЛОГИЯ

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ



BACT/ALERT® 3D



ИДЕНТИФИКАЦИЯ

CHROMagar®



VITEK® MS
(MALDI-TOF)

VITEK® ID cards



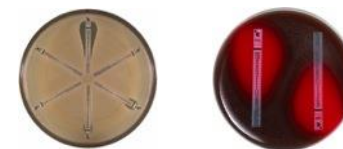
CHROMagar®



VITEK® 2 COMPACT



ETEST®



VITEK® AST cards





ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ПНЕВМОНИЙ И РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВКЛЮЧАЯ COVID

С ПРИМЕНЕНИЕМ КОМПЛЕКСНЫХ ПАНЕЛЕЙ FilmArray (BIOFIRE, США)

ЭТО COVID-19? ГРИПП? ИЛИ ЧТО-ТО ЕЩЕ?

После включения SARS-CoV-2 панель
BioFire RP2.1*plus* стала самым быстрым и
комплексным синдромным тестом на наличие
острых респираторных инфекций.

**Панель позволяет всего за 45 минут с высокой
точностью определить 23 вируса и бактерии,
являющиеся причиной заболеваний
органов дыхания.**

23 мишени

РЕСПИРАТОРНАЯ ПАНЕЛЬ

Панель для дифференциальной диагностики возбудителей заболеваний верхних дыхательных путей (Respiratory Panel) RP 2.1 plus.

Позволяет диагностировать 23 патогена, включая бактерии и вирусы.

Вирусы

SARS-CoV-2

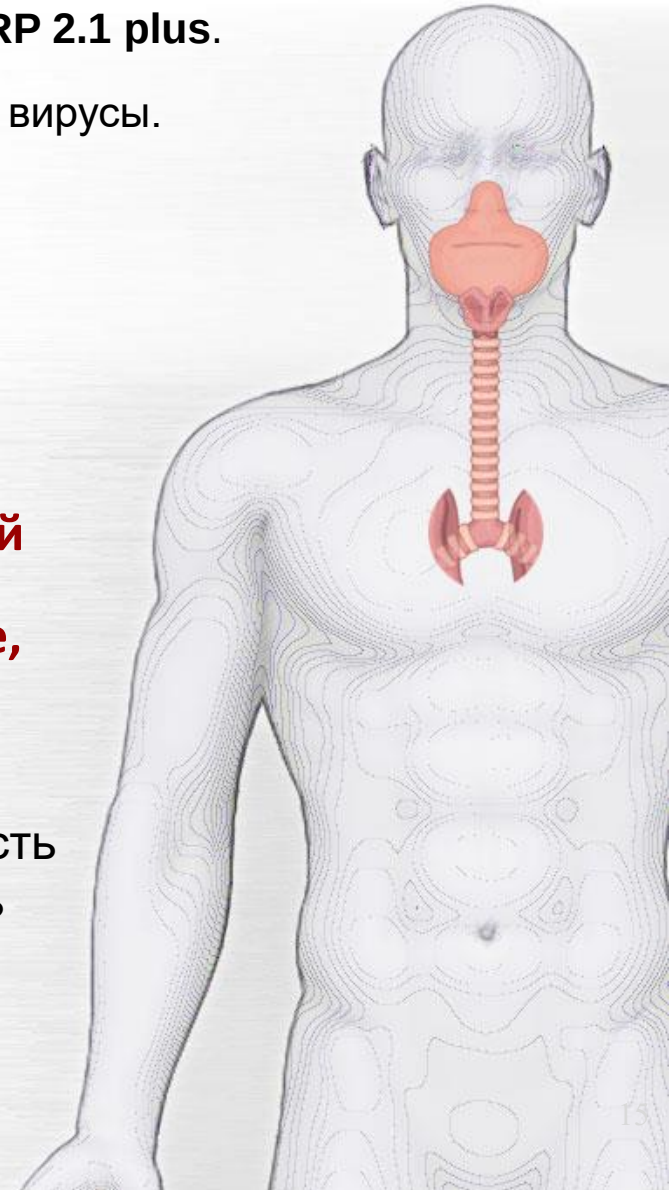
Adenovirus
Coronavirus 229E
Coronavirus HKU1
Coronavirus OC43
Coronavirus NL63
Coronavirus (Mers-CoV)
Human Rhinovirus/Enterovirus
Human Metapneumovirus
Middle East Respiratory Syndrome
Influenza A
Influenza A/H1 Influenza A/H1-2009
Influenza A/H3
Influenza B
Parainfluenza Virus 1
Parainfluenza Virus 2
Parainfluenza Virus 3
Parainfluenza Virus 4
Respiratory Syncytial Virus(RSV)

Бактерии

Bordetella pertussis
Bordetella parapertussis
Chlamydophila pneumoniae
Mycoplasma pneumoniae

Образец:
назофарингиальный
мазок в
транспортной среде,
объем 300 мкл

97,1% чувствительность
99,3% специфичность



СЛОЖНОСТИ ТРАДИЦИОННОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПНЕВМОНИЙ



- Возбудители пневмонии должны быть быстро определены для назначения соответствующего лечения, но их невозможно определить на основе только клинических признаков из-за перекрывающихся симптомов
- Необходимо использовать множество диагностических инструментов
- Задержки в соответствующей терапии связаны с неблагоприятными исходами

62 yr old
Pericardial
effusion

hMPV



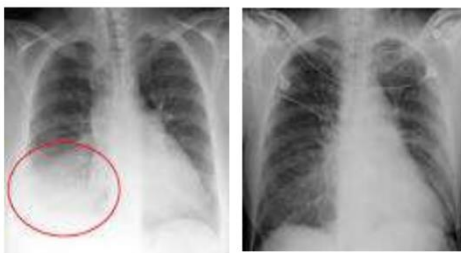
57 yr old
Left pleural
effusion

hMPV



52 yr old
Right middle
lobe pneumonia

hMPV



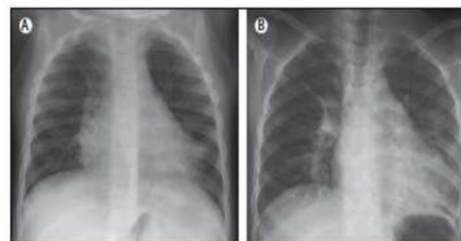
62 yr old
Bilateral ground
glass opacities

hMPV



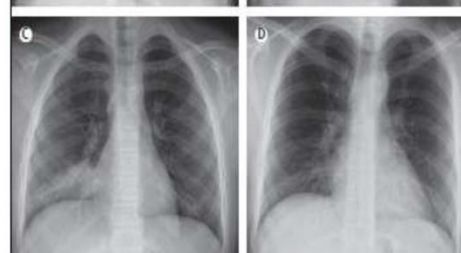
1 y/o:
alveolar infiltrates

human
rhinovirus



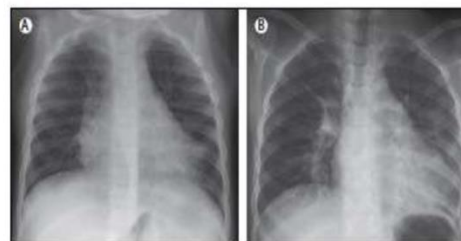
6 y/o:
alveolar infiltrates

EV-D68



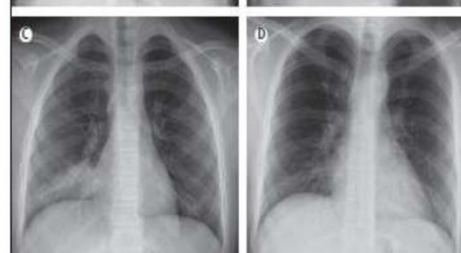
7 y/o:
alveolar infiltrates

human
metapneumovirus



16 y/o: alveolar
and interstitial
infiltrates

adenovirus



34 мишени

ПНЕВМО-ПАНЕЛЬ

Панель для дифференциальной диагностики возбудителей заболеваний нижних дыхательных путей (Pneumonia Panel plus).

Позволяет диагностировать 34 «мишени», среди которых 18 видов бактерий (в том числе 3 вида нетипичных), 9 видов вирусов, а также 7 генов, вызывающих антибиотикорезистентность.

Бактерии

Полу-количественно

Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex

Serratia marcescens

Proteus spp.

Klebsiella pneumoniae group

Enterobacter aerogenes

Enterobacter cloacae

Escherichia coli

Haemophilus influenzae

Moraxella catarrhalis

Pseudomonas aeruginosa

Staphylococcus aureus

Streptococcus pneumoniae

Klebsiella oxytoca

Streptococcus pyogenes

Streptococcus agalactiae

Атипичные бактерии

Количественно

Legionella pneumophila

Mycoplasma pneumoniae

Chlamydia pneumoniae

Вирусы

Influenza A

Influenza B

Adenovirus

Coronavirus

Parainfluenza virus

Respiratory Syncytial virus

Human Rhinovirus/Enterovirus

Human Metapneumovirus

Middle East Respiratory

Syndrome

Coronavirus (MERS-CoV)

Гены

резистентности

mecA/mecC and MREJ

KPC

NDM

Oxa48-like

CTX-M

VIM

IMP

Образец:

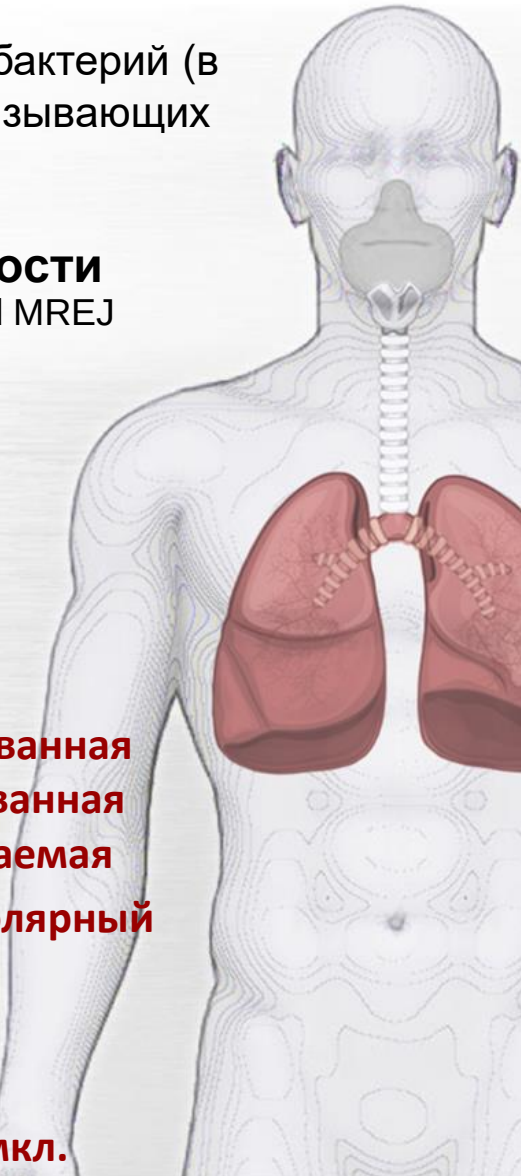
Мокрота

- **Индукцированная**
- **Аспирированная**
- **Откашливаемая**

Бронхоальвеолярный лаваж

- **BAL**
- **Mini – BAL**

Объем – 200 мкл.



FILMARRAY: ОДНА СИСТЕМА. МНОЖЕСТВО ПРИЛОЖЕНИЙ. ПАНЕЛИ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ.

Респираторная панель



23
мишени

- Бактерии
- Вирусы, включая **SARS-CoV-2**

Пневмо- панель



34
мишени

- Бактерии
- Вирусы
- Гены резистентности к антибиотикам

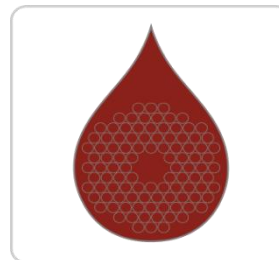
Менингиты Энцефалиты



14
мишеней

- Бактерии
- Вирусы
- Грибы

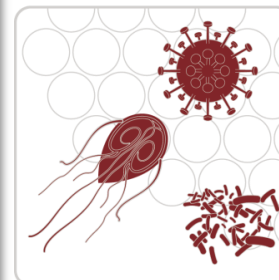
Панель идентификации культур крови



43
мишени

- Бактерии
- Дрожжи
- Гены резистентности к антибиотикам

Гастро- интестинальная панель



22
мишени

- Бактерии
- Вирусы
- Паразиты

АНАЛИЗАТОР ДЛЯ СИНДРОМНОЙ ДИАГНОСТИКИ НА ОСНОВЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР FILMARRAY (BIOFIRE, США)



Пробоподготовка

Амплификация

Детекция



- Масштабируемость – от одного до восьми модулей одновременно для выполнения до 176 запусков в сутки.
- Высокая пропускная способность
- Произвольный доступ
- Автоматизированное и эффективное управление данными
- Единое управление базой данных
- Интеграция с ЛИС благодаря технологии FilmArray Link
- Комплексные панели
- Несколько ответов в критически короткий период времени
- **Результаты в течение примерно 60 минут**

**ПЦР набор
ARGENE SARS-COV-2 R-GENE
для диагностики COVID-19
(BioMérieux S.A., Франция)**

ПЦР НАБОР ARGENE® SARS-COV-2 R-GENE

- Набор для ПЦР-анализаторов открытого типа.
- Предназначен для качественного обнаружения SARS-CoV-2 (коронавируса 2, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром) в мазках из носоглотки.
- Результат при использовании полностью автоматического ПЦР-анализатора получают в течение 4-5 часов
- В набор SARS-COV-2 R-GENE® входят 120 ПЦР-тестов для специфичного обнаружения SARS-CoV-2 (гены RdRp и N) и 30 общих ПЦР-тест, нацеленный на сарбековир (Sarbecovirus), включая SARS-CoV, SARS-подобный вирус и SARS-CoV 2 (Е-ген).
- Анализ ПЦР в режиме реального времени основан на амплификации определенных областей целевого генома. Обнаружение выполняется в рамках 5'-нуклеазного метода с использованием гидролизуемых зондов.
- У пациентов с показаниями для выявления SARS-CoV-2 результаты, полученные с помощью набора, помогают диагностировать COVID-19 в сочетании с другими методами медицинского обследования и с учетом эпидемиологического контекста.
- Данный набор предназначен исключительно для диагностики *in vitro* в клинических лабораториях и может использоваться только медицинскими работниками.

АМПЛИФИКАЦИЯ И ОБНАРУЖЕНИЕ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Анализ ПЦР в режиме реального времени основан на амплификации определенных областей целевого генома. Обнаружение выполняется в рамках 5'-нуклеазного метода с использованием гидролизуемых зондов.

В наборе SARS-COV-2 R-GENE® содержатся все необходимые для обнаружения реагенты:

- **PCR1** (120 тестов)

- специфичный ПЦР-тест в отношении генома SARS-CoV-2 в триплексной реакции:
- ген N SARS-CoV-2 при **530 нм** (размер амплифицированного фрагмента составляет 148 п.о.),
- ген RdRp SARS-CoV-2 при **670 нм** (размер амплифицированного фрагмента составляет 136 п.о.) и внутренний контроль при **560 нм**.

- **PCR2** (30 тестов)

- общий ПЦР-тест в отношении геномов сарбековируса (SARS-CoV, SARS-CoV-2, SARS-подобные вирусы) в триплексной реакции:
- ген E сарбековируса при **530 нм** (размер амплифицированного фрагмента составляет 148 п.о.),
- клеточный контроль (ген HPRT1) при **670 нм** (размер амплифицированного фрагмента составляет 108 п.о.),
- внутренний контроль при **560 нм**.

СОСТАВ И ОПИСАНИЕ НАБОРА

Количество тестов: 120 в PCR1 и 30 в PCR2

Набор включает объем реагентов, достаточный для проведения максимум 8-ми циклов ПЦР.

Код	Название	Состав	Форма выпуска
W0	Вода (сверхчистая)	-	2 x 1,8 мл
IC1 (зеленый)	Внутренний контроль 1	Готовый к использованию внутренний контроль РНК	2 x 1,1 мл
R01 (красный)	SARS-COV-2 готовая смесь для амплификации	Содержит dNTP, MgCl ₂ , буфер для амплификации, праймеры и зонды для испытуемых мишеней и внутреннего контроля, а также Taq-полимеразу. Готовая смесь для амплификации R01 используется только для работы с PCR1.	2 x 900 мкл
R02 (синий)	САРБЕКОВИРУС готовая смесь для амплификации	Содержит dNTP, MgCl ₂ , буфер для амплификации, праймеры и зонды для испытуемых мишеней и внутреннего контроля, а также Taq-полимеразу. Готовая смесь для амплификации R02 используется только для работы с PCR2.	1 x 450 мкл
PC1 (фиолетовый)	SARS-COV-2 положительный контроль	2 транскрипта для SARS-CoV-2. PC1 используется только для работы с PCR1.	1 x 110 мкл
PC2 (розовый)	САРБЕКОВИРУС и положительный контроль Сс	1 транскрипт для сарбековируса и 1 плазида для клеточного контроля. PC2 используется только для работы с PCR2.	1 x 110 мкл
RT (оранжевый)	Обратная транскриптаза Superscript® III (концентрированная)	-	1 x 15 мкл

ТИПЫ ОБРАЗЦОВ

- Мазки из носоглотки

Если образцы не были обработаны по прибытии, они могут храниться следующим образом:

- 6 часов при +18 °C/+25 °C
- 72 часа при +2 °C/+8 °C
- 4 месяца при -15 °C/-31 °C или при ≤ -60 °C с максимум 3-мя циклами замораживания/оттаивания



СРОК ГОДНОСТИ
24 МЕСЯЦА ОТ ДАТЫ
ПРОИЗВОДСТВА

ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И АМПЛИФИКАЦИИ, УТВЕРЖДЕННЫЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ

ЭКСТРАКЦИЯ	АМПЛИФИКАЦИЯ
• EMAG® • NUCLISENS® easyMAG® • MagNA Pure Compact • MagNA Pure 96 • QIAsymphony SP	Rotor-Gene Q Applied Biosystems • 7500 Fast • 7500 Fast Dx • QuantStudio 5 (блоки для 96-луночных планшетов на 0,1 мл и 0,2 мл) • QuantStudio 5 Dx LightCycler 480 (Система II) CFX96

НЕОБХОДИМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В СОСТАВ НАБОРА

- Системы для экстракции, утвержденные к использованию с набором; следуйте инструкциям производителя.
- Платформы для амплификации, утвержденные к использованию с набором.
- Центрифуга, подходящая для работы с платформой для амплификации.
- Пробирки или планшеты, подходящие для работы с платформой для амплификации, утвержденные к использованию с набором.
- Охлаждающий блок, подходящий для работы с платформой для амплификации, утвержденный к использованию с набором.
- УФ-излучение.
- Рабочая станция или экран из органического стекла для добавления образцов и готовых смесей.
- Микропипетки и стерильные наконечники для фильтров с соответствующим объемом дозирования.

НАДЕЖНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДАЖЕ ЕСЛИ ВИРУС МУТИРУЕТ

PCR1	PCR2
SARS-COV-2	SARBECOVIRUS
специфичный	общий
Гены мишени – N-Ген и RdRp-Ген	Ген-мишень – E-ген
N Gene (FAM) / IC1 (HEX) / RdRp Gene (CY5)	N Gene (FAM) / IC1 (HEX) / Cell control (CY5)
• Специфическое обнаружение SARS-COV-2 в двух разных генах • Внутренний контроль, оценивающий качество всего процесса ПЦР от экстракции до детекции	• Общее обнаружение SARBECOVIRUS (SARS-COV, SARS-COV-2, SARS-LIKE) • Внутренний контроль, оценивающий качество всего процесса ПЦР от экстракции до детекции • Клеточный контроль, оценивающий качество отобранного материала (для валидации качества клинического образца путем определения наличия человеческих клеток)



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

Мы работаем в Казахстане
и работаем для Вас!

www.mediland.kz
mail@mediland.kz