



Институт
Аналитической
Токсикологии

Перспективы применения микробиологических исследований методом масс-спектрометрии без выделения чистых культур

научный сотрудник
отдела исследований и разработок

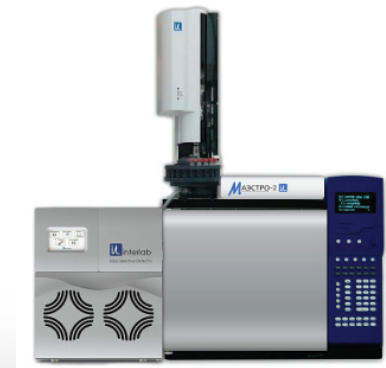
к.х.н. Быстрова Ольга Витальевна

Почему МСММ?

Метод масс-спектрометрии микробных маркеров

Отечественная разработка, не имеющая зарубежных аналогов,
реализованная на оборудовании отечественного производства

- Без выделения чистых культур
- Анализ исходного биоматериала
- Универсальные доступные реактивы
- Оборудование «базового» уровня



История создания метода МСММ

Этапы разработки

1993-2000 Разработка алгоритма определения состава микробных сообществ

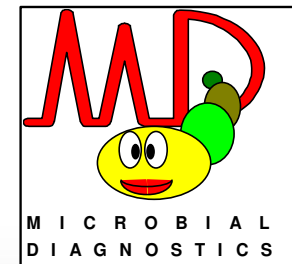
1997-2007 Апробация метода в медицинской практике

2009 Регистрация новой медицинской технологии в Росздравнадзоре
№ НЮ-40006 от 17.08.2009г.

2010 Разрешение на применение новой медицинской технологии «Оценки
микроэкологического статуса человека методом хромато-масс-спектрометрии» на
территории Российской Федерации (Разрешение ФС 2010/038 от 24.02.2010)

Внедрение методики:

- Учебно-методические пособия
- Публикации результатов в научных изданиях
- Формирование приборной базы



Справка о методе МСММ

Метод масс-спектрометрии микробных маркеров

Новая медицинская технология

«Оценка микробиологического статуса человека
методом хромато-масс-спектрометрии»

Разрешение на применение МСММ

ФС № 2010/038 от 24.02.2010г

Коллектив авторов: д.б.н., профессор Осипов Г.А.,

д.м.н., профессор Белобородова Н.В., д.м.н.

Пахомова А.А., д.м.н. Ильин В.К., к.б.н. Родионова Т.А.,

д.м.н. Мухамедиева Л.Н., член-корр. РАН Орлов О.И.,

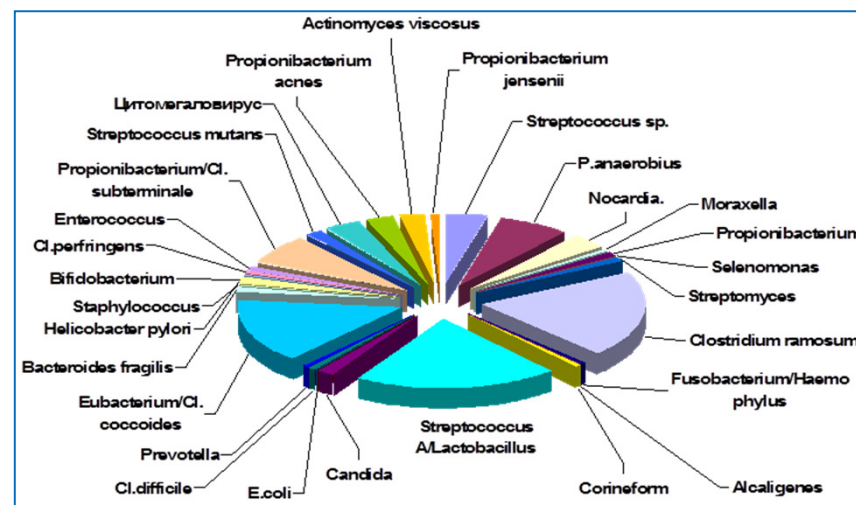
академик РАМН, профессор Баранов В.М.



Реконструкция микробного сообщества в пробе

Метод МСММ основан на количественном определении маркерных веществ микроорганизмов **непосредственно в клиническом материале**

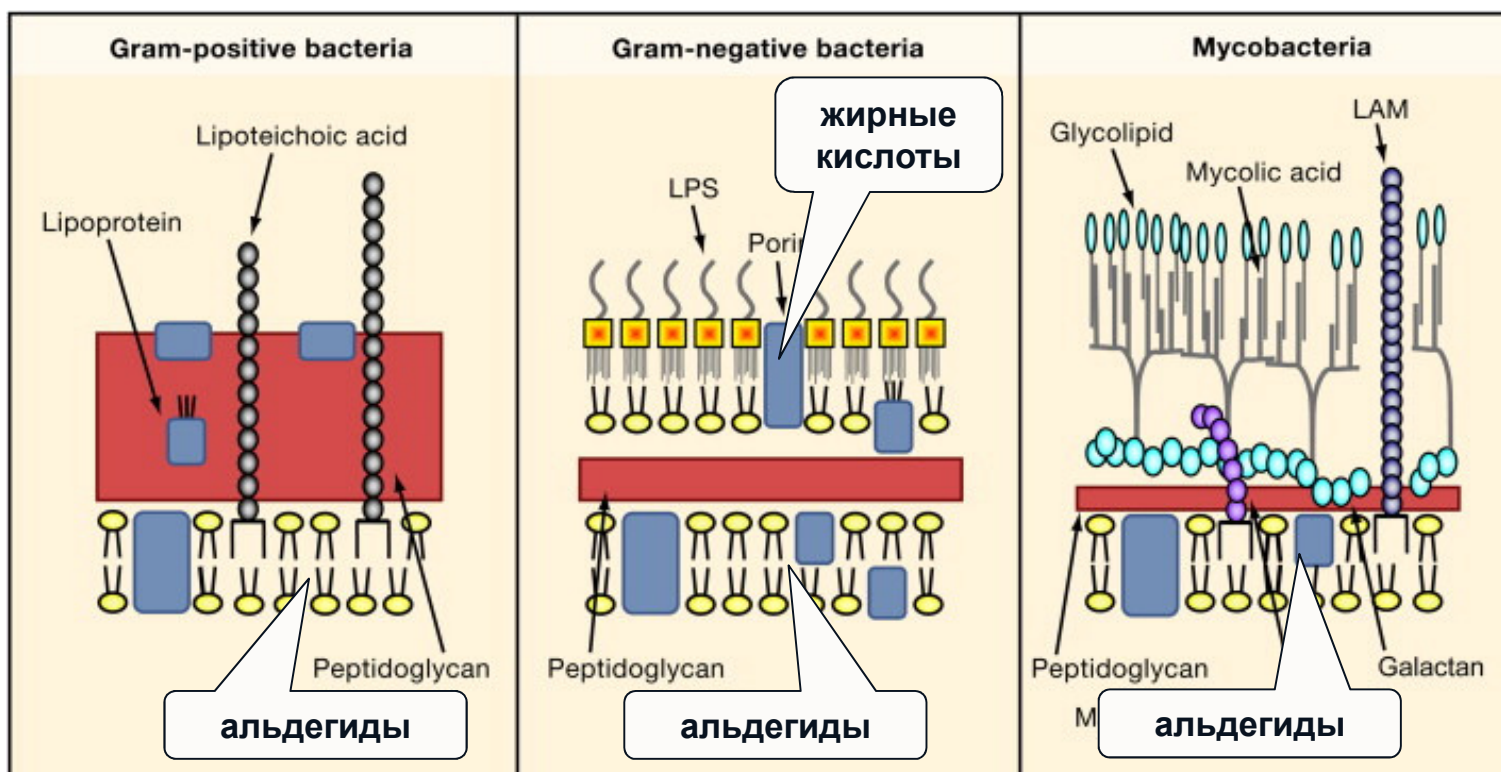
- Метод не требует выделения чистой культуры
- В одной пробе за один анализ определяет 57 микроорганизмов, включая вирусы и грибы
- Количественно оценивает вклад каждого компонента, определяет состав микробного сообщества



Микробиоценоз ротоглотки при мононуклеозе.
(Адеишвили П.С. Детские инфекции. 2012,11,12-16).

Микробные маркеры для МСММ

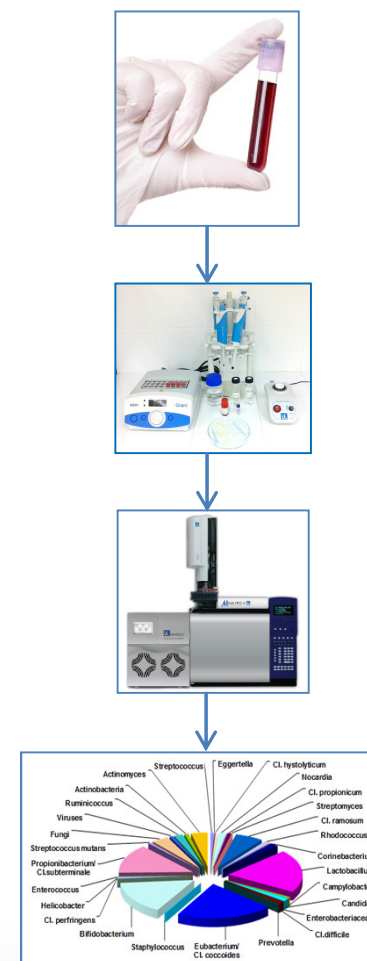
Маркеры – молекулярные компоненты клеточных оболочек микроорганизмов
(для вирусов и грибов – продукты метаболизма, специфические стерины)



<http://theamazingmedicine.blogspot.ru/2013/07/microbiology-iv-domain-bacteria.html>

Характеристики метода МСММ

- Анализ непосредственно в клиническом материале без выделения чистой культуры
- Одновременное количественное определение 57 микроорганизмов *in situ*
- Количественная оценка вклада каждого микроорганизма в инфекцию
- Чувствительность 10^3 - 10^4 клеток/мг образца
- Селективность – до вида при наличии маркера
- Результат через 2 часа с момента поступления пробы в лабораторию



Определяемые микроорганизмы

В одной пробе, за один анализ, количественно

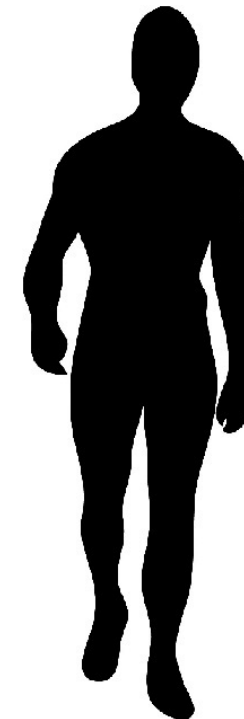
Кокки, бациллы, коринебактерии	21. Peptostreptococcus anaerobius 18623	41. Helicobacter pylori
1. Bacillus cereus	22. Peptostreptococcus anaerobius 17642	42. Campylobacter mucosalis
2. Bacillus megaterium	23. Prevotella spp.	Грам-отрицательные палочки
3. Corynebacterium spp.	24. Propionibacterium spp.	43. Alcaligenes spp. / Klebsiella spp.
4. Streptococcus spp.	25. Propionibacterium acnes	44. Kingella spp.
5. Streptococcus mutans (анаэробные)	26. Propionibacterium freudenreichii	45. Flavobacterium spp.
6. Staphylococcus aureus	27. Propionibacterium jensenii	46. Moraxella spp./Acinetobacter spp.
7. Staphylococcus epidermidis	28. Ruminococcus spp.	47. Porphyromonas spp.
Анаэробы	29. Veillonella spp.	48. Pseudomonas aeruginosa
8. Bacteroides fragilis	Аэробные актинобактерии	49. Stenotrophomonas maltophilia
9. Bifidobacterium spp.	30. Actinomyces spp.	Грибы, дрожжи
10. Blautia coccoides	31. Actinomyces viscosus	50. Aspergillus spp.
11. Clostridium spp.(группа C. tetani)	32. Nocardia spp.	51. Candida spp.
12. Clostridium difficile	33. Nocardia asteroides	52. Микр грибы, кампестерол
13. Cl. histolyticum/Str. pneumonia	34. Mycobacterium spp.	53. Микр грибы, ситостерол
14. Clostridium perfringens	35. Pseudonocardia spp.	Вирусы
15. Clostridium propionicum	36. Rhodococcus spp.	54. Herpes spp.
16. Clostridium ramosum	37. Streptomyces spp.	55. Цитомегаловирус
17. Eubacterium spp.	38. Streptomyces farmamarensis	56. Эпштейна-Барр вирус
18. Eggerthella lenta	Энтеробактерии, энтерококки	Хламидии
19. Fusobacterium spp./Haemophilus spp.	39. Enterobacteriaceae spp. (E.coli и пр)	57. Chlamydia trachomatis
20. Lactobacillus spp.	40. Enterococcus spp.	

**Перспективные преимущества
преаналитического этапа
технологии MCMM**

Подготовка пациента не требуется

Минимальные ограничения для пациента

- Нет необходимости в отмене лекарств, включая антибиотики
- Кровь отбирается вне зависимости от приема пищи
- Слюна отбирается утром до завтрака и гигиены полости рта
- Мазки отбираются так, как это принято для других исследований



Нет ограничений по клиническому материалу

Универсальность в отношении принимаемого биоматериала

- | | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Аспират из матки | 12. Отделяемое глаза |
| 2. Биоптат тканей | 13. Отделяемое носа |
| 3. Бронхоальвеолярный лаваж | 14. Раневое отделяемое |
| 4. Вагинальное содержимое | 15. Секрет простаты |
| 5. Дренаж | 16. Слюна |
| 6. Кровь | 17. Смыв трахеи |
| 7. Ликвор | 18. Соскоб кожи |
| 8. Мазок из зева | 19. Фекалии |
| 9. Мазок из уретры | 20. Моча |
| 10. Мазок из уха | 21. Эякулят |
| 11. Мазок из цервикального канала | <i>Другие пробы при необходимости</i> |

Нет ограничений по средствам отбора

Универсальность в отношении средств отбора

- Стандартные пробирки для отбора венозной и капиллярной крови с ЭДТА
- Стандартные зонд-тампоны, щеточки без транспортных сред
- Стандартные контейнеры для сбора мочи и фекалий
- Сухие чистые пробирки типа Эппендорф
- Сухие чистые пробирки с крышкой для химических лабораторий



Нет жестких ограничений по транспортировке

Широкие допуски по условиям отбора и транспортировки

- Нет необходимости в сохранении живых микроорганизмов в пробе
- Возможность транспортировать пробу при комнатной температуре в течение 12 часов
- Возможность хранить пробу в холодильнике при +4 С в течение 24 часов
- Возможность замораживать пробы и транспортировать «партиями»
- Возможность высушивать пробы и пересылать

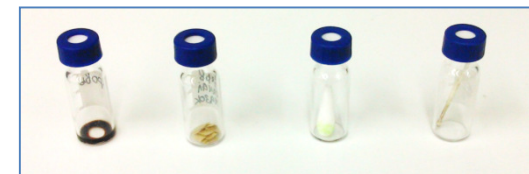


**Перспективные преимущества
аналитического этапа
технологии MSMM**

Пробоподготовка – химическая процедура

Универсальная процедура без специальных требований к реагентам

- Процедура пробоподготовки универсальна для всех типов биоматериалов
- Процедура пробоподготовки универсальна для всех типов «носителей»
- Состоит из рутинных операций: дозирование, перемешивание, нагрев
- Используется минимальный объем реагентов «настольного» хранения
- После обработки все пробы биологически безопасны и могут храниться в течении недели



Готовое приборное решение

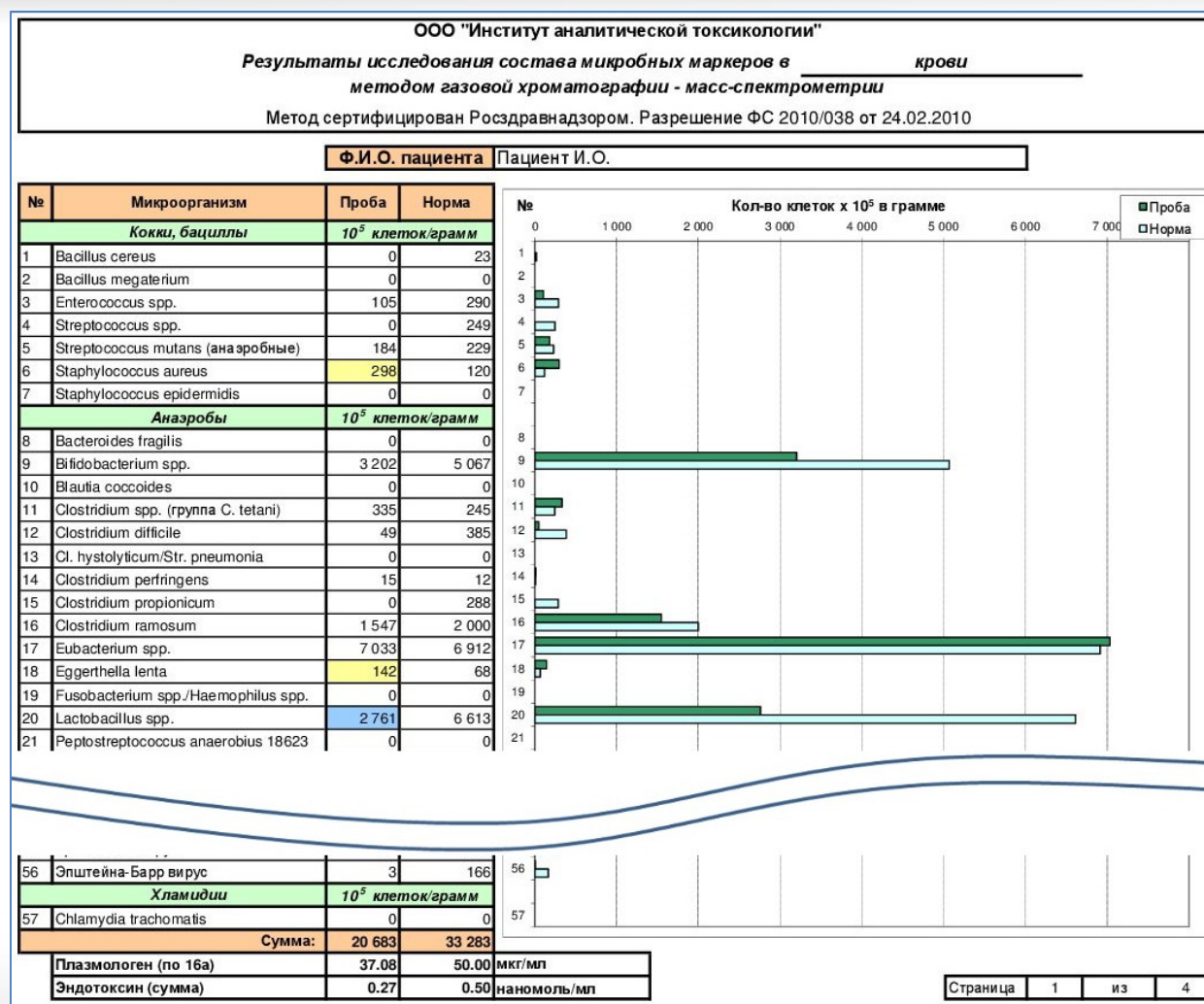
Микробиологический анализатор Маэстро

- Анализатор отечественного производства (ООО «Интерлаб», Москва)
- Сконфигурирован под метод МСММ
- Возможность серийного анализа без присутствия оператора
- Полный пакет программного обеспечения
- Инструкции, адаптированные для неспециалистов в области ГХ-МС анализа
- Стандартизованная форма отчета для возможности межлабораторного контроля



Наглядное представление результатов

- Результат анализа
 $X \times 10^5$ клеток/грамм
- Значение «нормы»,
при наличии
- Цветовая маркировка
«превышений» и
«дефицита»
- Графическая
визуализация



Место МСММ в практике



Метод существенно расширяет информацию о пациенте, поступающую лечащему врачу, и позволяет:

- Увидеть расширенный состав микробного сообщества в пробе
- Получить информацию о трудно культивируемых микроорганизмах
- Выявить основные патогены в составе полимикробной инфекции
- Диагностировать состояние дисбиоза

Диагностика инфекции методом МСММ

«Инфекция – избыточный рост микроорганизмов»

Академик Воробьев А.А.

**Любых! Как стафилококков с псевдомонадами,
так и клостридий, эубактерий, актинобактерий,
бактероидов, лактобацилл и бифидобактерий**

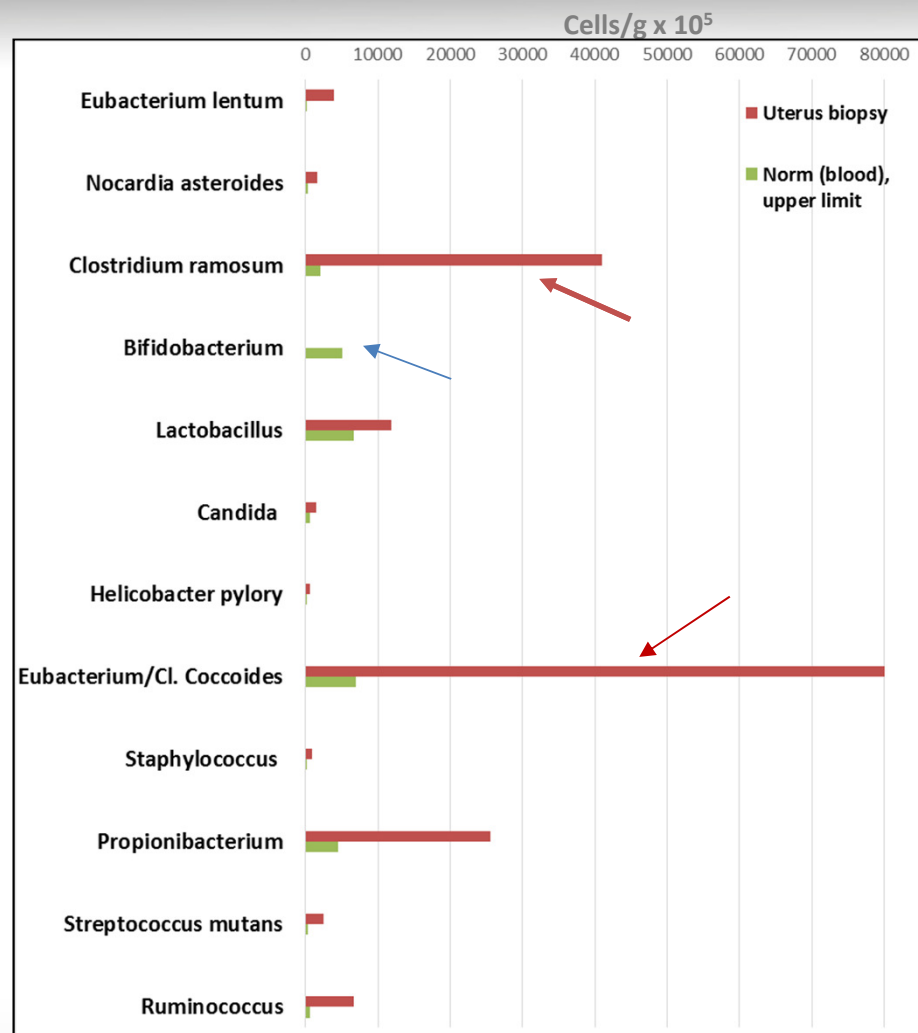
**Совместно! Не вызывает сомнений смешанный
(полимикробный) характер инфекции, вызываемой
сообществом, объединенным в биопленку**

Диагностика инфекции методом МСММ

Выявление агента инфекции

Микробные маркеры в биоптате матки

- Микробные доминанты:
Clostridium ramosum, группы
Eubacterium/*Cl. coccoides*,
Propionibacterium/*Cl. subterminale*.
- Обнаруженное количество
Eubacterium/*Cl. coccoides* в 15 раз
превышает ожидаемое
- Наблюдается дефицит
бифидобактерий



Диагностика инфекции методом МСММ

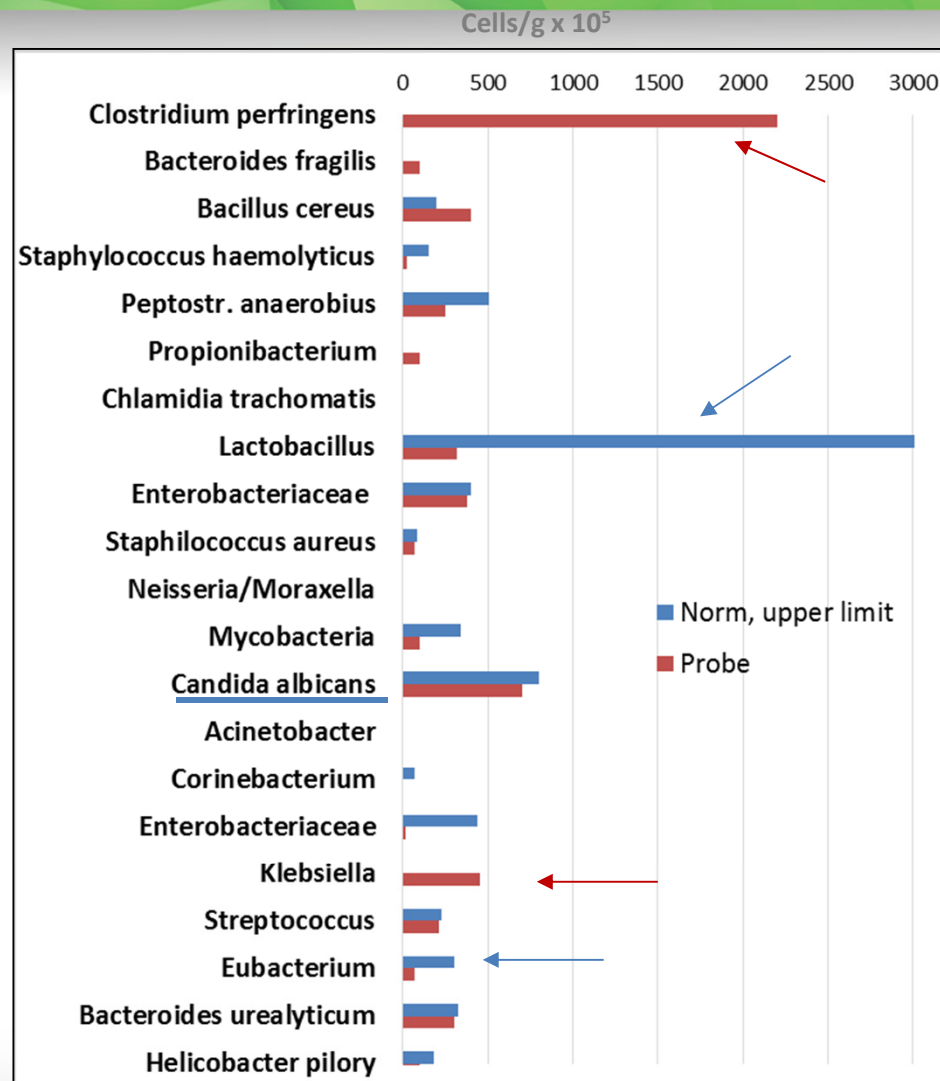
Уточнение этиологии инфекционного процесса

Ложный кандидоз

➤ Отсутствие *Candida albicans* в клинически значимом количестве

➤ Агенты воспаления: *Cl. perfringens*, *Klebsiella*,

➤ Наблюдается дефицит компонентов нормофлоры: *Lactobacillus*, *Eubacterium*



Диагностика инфекции методом МСММ

Контроль за терапией

Результат анализа мочи пациента
до и после лечения

- Микробные доминанты:
Clostridium perfringens,
анаэробный пептострептококк.
- Обнаруженное количество
Lactobacillus демонстрирует эффект
транслокации нормофлоры в очаги
инфекционного процесса

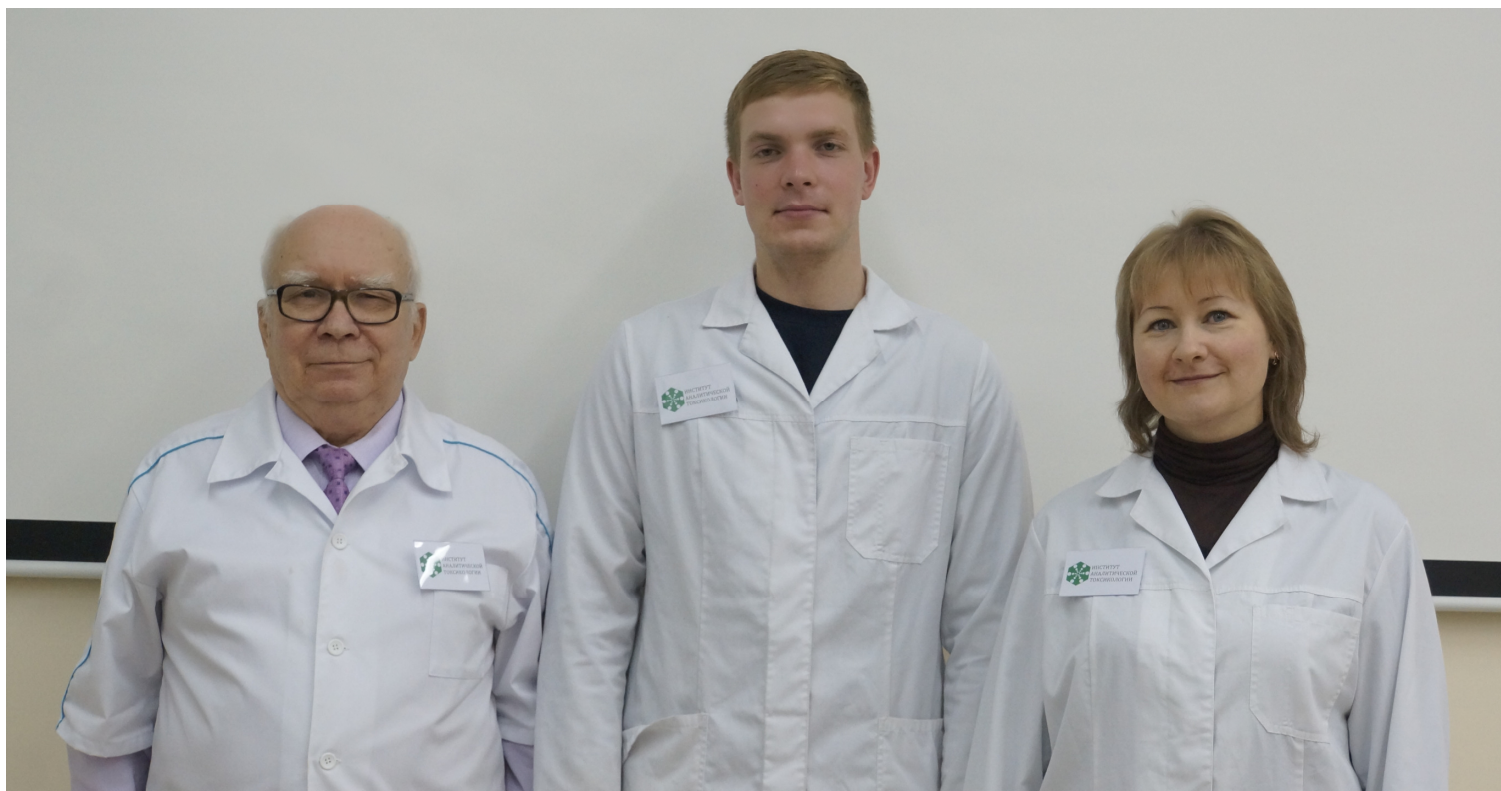
Анаэробы	N40,N41.1	N41.1
<i>Bacteroides fragilis</i>	5	0
<i>Bifidobacterium</i> spp.	14	4
<i>Clostridium</i> spp. (группа <i>C. tetani</i>)	27	2
<i>Cl. histolyticum</i> /Str. pneumonia	0	5
<i>Clostridium perfringens</i>	176	0
<i>Clostridium ramosum</i>	6	0
<i>Eubacterium</i> spp.	19	0
<i>Eggerthella lenta</i>	4	2
<i>Lactobacillus</i> spp.	170	1
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	57	0
<i>Prevotella</i> spp.	14	0
<i>Propionibacterium</i> spp.	4	0
<i>Propionibacterium acnes</i>	2	0
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	1	3
Грибы, дрожжи		
<i>Aspergillus</i> spp.	27	1
Микр грибы, кампестерол	3	0
Микр грибы, ситостерол	7	0
Сумма	599	26

Перспективы применения некультуральных микробиологических исследований методом масс-спектрометрии микробных маркеров

- **Передовая отечественная методическая разработка, реализованная на оборудовании отечественного производства:**
 - разумное ценовое решение, простота работы и обслуживания, доступность информационной поддержки от разработчиков метода и сервисной поддержки производителя оборудования
 - унифицированные процедуры отбора и пробоподготовки исключают неверную диагностику из-за ошибок на преаналитическом этапе, применение простых реагентов минимизирует затраты лабораторий на расходные материалы
- **Методический подход инфекционной диагностики методом МСММ обеспечивает более полное понимание микробной этиологии заболеваний:**
 - дает расширенную информацию о составе микробного сообщества, о роли анаэробов, актинобактерий, вирусов и грибов
 - выявляет скрыто протекающие инфекционно-воспалительные процессы, патогены при хронических процессах неуточненного генеза

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

Отдел исследований и разработок ООО «ИАТ»



Осипов Г. А.
д.б.н., профессор
ведущий научный сотрудник

Агудин П.С.
младший
научный сотрудник

Быстрова О.В.
к.х.н.
научный сотрудник

www.iat.com.ru

+7(926)174-14-71

info@iat.com.ru