



ДИАГНОСТИКА
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ

Анализ микробиоты кишечника и экспресс-диагностика острых кишечных инфекций методом ПЦР

Суворова, Е.А. Тарасова, М.В. Куртуков, В.И. Людыно, А.Н.
Суворов, ООО «НИЛ Диагностика», НИИЭМ СЗО РАМН, Военно-
медицинская академия, Санкт-Петербург

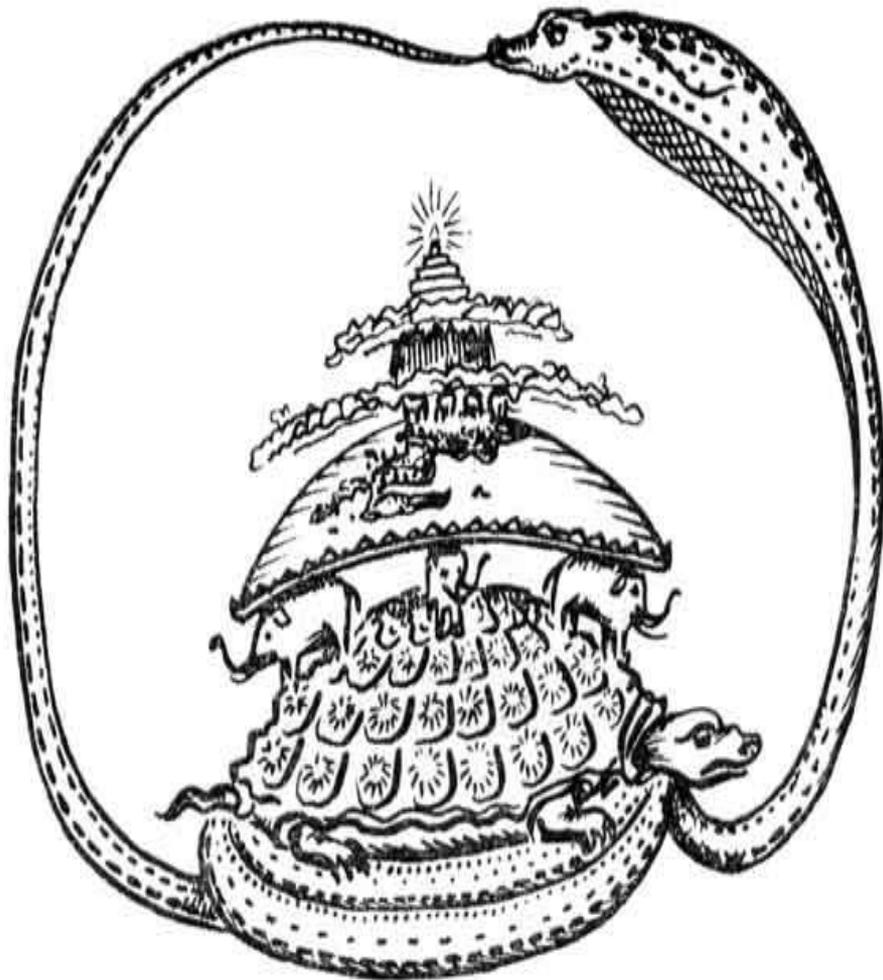
Три вопроса клинициста к микробиологу

- ▣ Из каких микробов состоит кишечная флора?
 - ▣ Как определить ее состав?
 - ▣ Зачем это делать?
- 

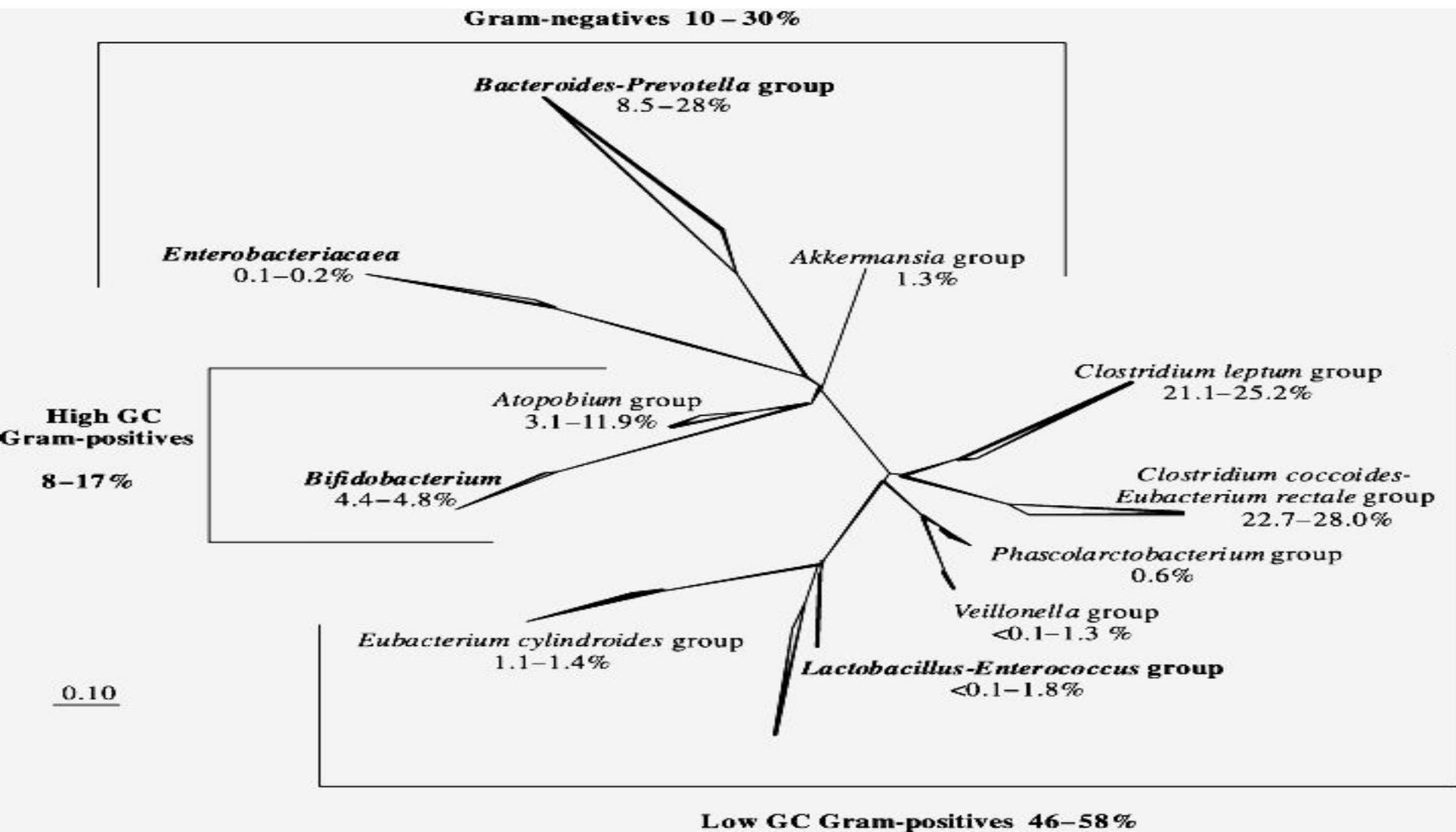
Состав кишечной микрофлоры по ОСТ 91500.11.0004-2003

Наименование микроорганизмов	Возраст, годы		
	<1	1-60	>60
Бифидобактерии	$10^{10} - 10^{11}$	$10^9 - 10^{10}$	$10^8 - 10^9$
Лактобактерии	$10^6 - 10^7$	$10^7 - 10^8$	$10^6 - 10^7$
Бактероиды	$10^7 - 10^8$	$10^9 - 10^{10}$	$10^{10} - 10^{11}$
Энтерококки	$10^5 - 10^7$	$10^5 - 10^8$	$10^6 - 10^7$
Фузобактерии	$<10^6$	$10^8 - 10^9$	$10^8 - 10^9$
Эубактерии	$10^6 - 10^7$	$10^9 - 10^{10}$	$10^9 - 10^{10}$
Пептострептококки	$<10^5$	$10^9 - 10^{10}$	10^{10}
Клостридии	$\leq 10^3$	$\leq 10^5$	$\leq 10^6$
<i>E.coli</i> типичные	$10^7 - 10^8$	$10^7 - 10^8$	$10^7 - 10^8$
<i>E.coli</i> лактозонегативные	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$
<i>E.coli</i> гемолитические	0	0	0
Другие условно-патогенные энтеробактерии	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$
Стафилококк золотистый	0	0	0
Стафилококки сапрофитный, эпидермальный)	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i>	$\leq 10^3$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
Неферментирующие бактерии	$\leq 10^3$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$

Состав кишечной микрофлоры по ОСТ 91500.11.0004-2003



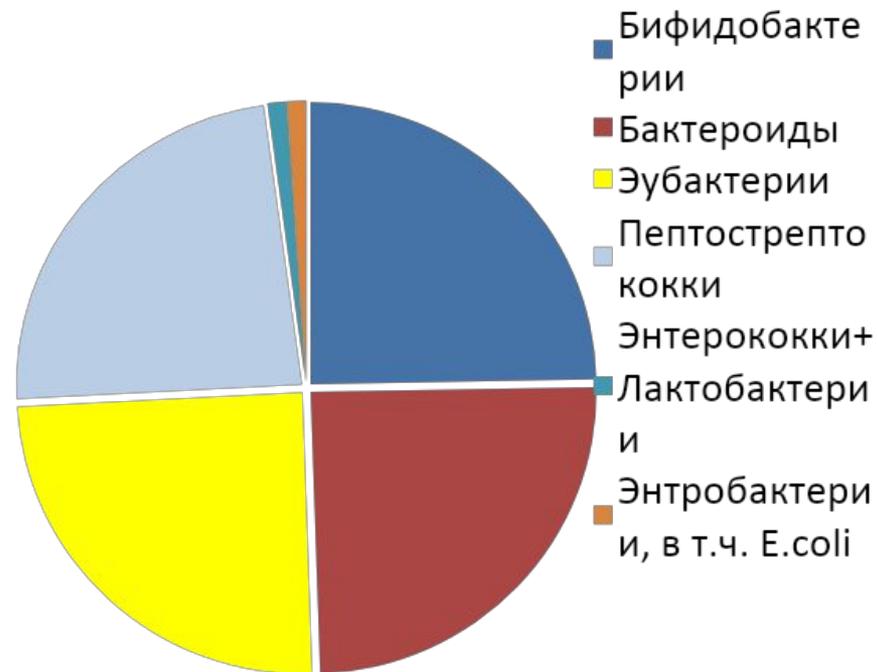
Наиболее распространенные обитатели кишечника (Zoetendal E., 2006)



Состав микрофлоры взрослого человека (Европа)



Состав микрофлоры взрослого человека по ОСТ91500.11.0004-2003



Методы определения микрофлоры кишечника

- Бактериологический посев
- Микроскопия
- Дыхательный тест
- Генно- молекулярные методы

PCR/denaturing electrophoretic polyacrylamide gels (PCR/DGGE, PCR/TTGE)

Fluorescent in situ hybridization/fluorescence-activated cell sorting (FISH/FC)

16S rRNA филогения

Метагеномика

Мета транскриптомика

ПЦР в режиме реального времени

Анализируемые показатели

	Бактериологическое исследование	Исследование методом ПЦР в реальном времени
<i>Bacteroides spp.</i>	-	+
<i>Clostridium spp.</i> (<i>C. difficile</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. butyricum</i>)	(+/-)*	+
<i>Fecalibacterium prauznitzii</i> (основной представитель (<i>C. leptum group</i>))	-	+
<i>Lactobacillus spp.</i>	+	+
<i>Bifidobacterium spp.</i>	+	+
<i>Escherihia coli</i>	+	+
Патогенные микроорганизмы: <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aerogenosa</i> , <i>Proteus spp.</i> и др.	+	+
<i>Enterococcus spp.</i>	+	+

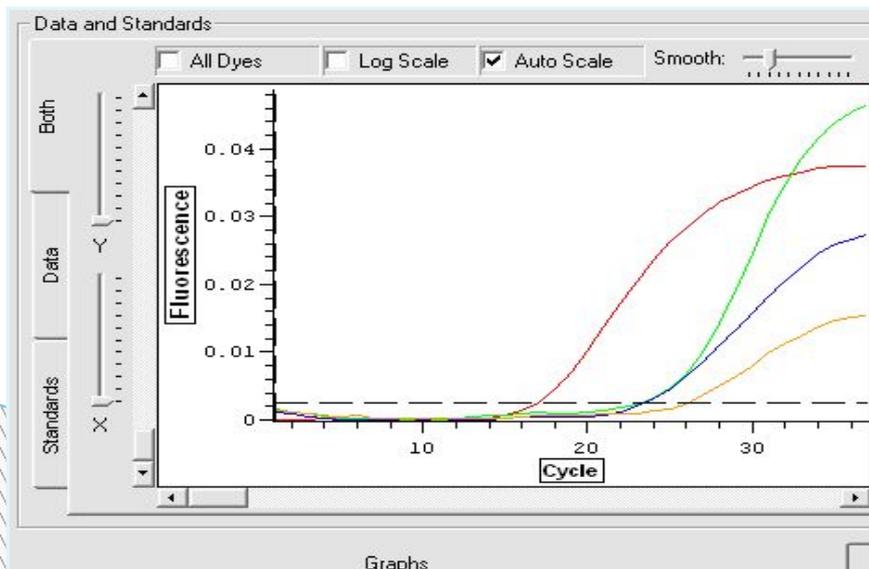
Преимущества и недостатки метода ПЦР в реальном времени:

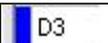
- + эффективность в обнаружении анаэробных бактерий**
- + быстрота выполнения (1-2 суток)**
- + доступные условия транспортировки анализируемого материала до лаборатории (до двух дней в холодильнике)**
- невозможность подбора противомикробных препаратов

Анализ микробиоценоза кишечника методом ПЦР в реальном времени

Этапы исследования:

1. Выделение бактериальной ДНК
2. Амплификация специфических участков бактериального генома и детекция флуоресцентного сигнала в реальном времени
3. Расчет количественного соотношения бактерий по величине порогового цикла (абсолютное количество и отношение к общему бактериальному числу)

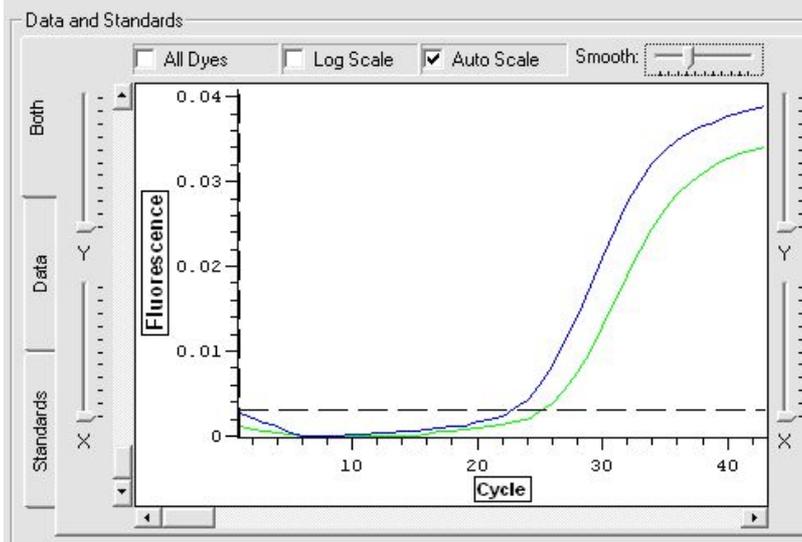


-  B3 - *Bacteroides fragilis*
-  C3 - *Lactobacillus* spp
-  D3 - *Bifidobacterium* spp
-  E3 - *Escherichia coli*

Основные варианты дисбиотических нарушений, выявляемые методом ПЦР в реальном времени

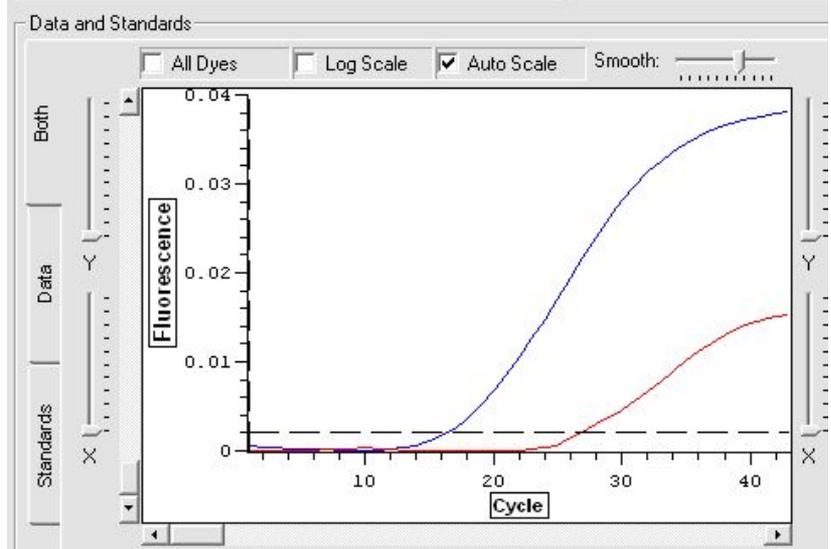
1. значительное увеличение числа *Bacteroides fragilis* и соответственно изменение количественного соотношения *Bacteroides fragilis*/*Fecalibacterium prauznitzii*.

Норма



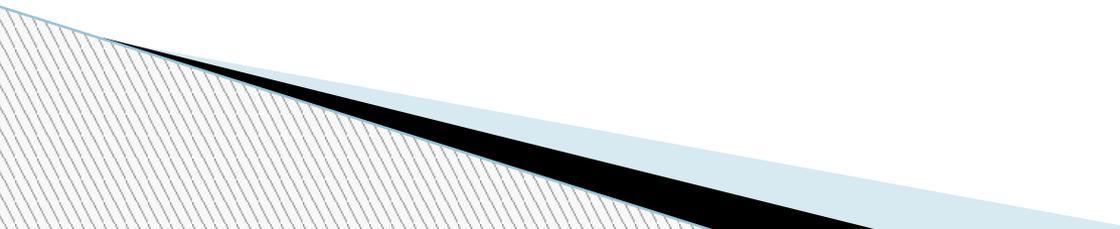
D3 - *Bacteroides fragilis* (Ct=23)
C3 - *Fecalibacterium prauznitzii* (Ct=25)

Патология
(язвенный колит)



D3 - *Bacteroides fragilis* (Ct=16)
B3 - *Fecalibacterium prauznitzii* (Ct=28)

2. *Выявление в диагностически значимых количествах ($>10^4$) представителей условно-патогенной флоры (*Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*), в особенности штаммов, несущих гены патогенности*

 3. *Изменение соотношения субпопуляций анаэробных бактерий, осуществляющих различные виды брожения (например, продуцентов бутирата и продуцентов пропионата)*
- 

Экспресс дифференциальная диагностика ОКИ

▣ Перечень возбудителей (всего 14) :

- ротавирусы (типов А, В и С)
- норовирусы (1 и 2 типа)
- аденовирус (тип F)
- астровирус
- вирус гепатита А
- парвовирус В19
- энтеровирусы

- Shigella spp.
- Salmonella spp.
- Campylobacter spp.
- ЭНТЕРОИНВАЗИВНЫЕ Escherichia coli
- Clostridium dificile (ТОКСИН А и ТОКСИН В)
- Yersinia pseudotuberculosis
- Yersinia enterocolitica