

Ускоренные методы идентификации положительных гемокультур с применением MALDI-TOF масс-спектрометрии

Д. А. Попов, Е. А. Надточей, Т. Ю. Вострикова, С. Т. Овсеенко

ФГБУ «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева» Минздрава России, Москва, Россия

Цель. Оценить результаты идентификации положительных гемокультур при применении метода MALDI-TOF масс-спектрометрии (MS).

Материал и методы. На первом этапе с помощью метода MALDI-TOF MS проведено исследование *in vitro*, в которое было включено 11 различных видов микроорганизмов: *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*. В процессе субкультивирования ежедневно осуществлялись попытки их идентификации с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра (Vitek MS, bioMérieux, Франция) до получения корректных результатов идентификации. На втором (клиническом) этапе работы исследовано 360 положительных гемокультур от 187 кардиохирургических пациентов. В параллели с рутинным способом (суточное субкультивирование с последующим MALDI-TOF MS-анализом) изучены характеристики двух ускоренных методов идентификации гемокультур. Методом сокращенного субкультивирования исследовано 300 образцов (284 монокультуры). Методом прямой идентификации возбудителей бактериемии (минуя этап высева на плотные питательные среды) исследовано 211 образцов (201 монокультура). В 151 случае идентификация проводилась параллельно двумя ускоренными методами.

Результаты. На первом этапе время субкультивирования культур на кровяном агаре, требовавшееся для их полной идентификации, не превышало 5 ч для флаконов с полимерными гранулами и 6 ч при использовании флаконов с активным углем. Соответствующие показатели для дрожжеподобных грибов составляли от

10 до 22 ч. После сокращенного субкультивирования на кровяном агаре монокомпонентных гемокультур методом MALDI-TOF MS было идентифицировано 259 из 284 (91,2%) микроорганизмов. Доля успешной идентификации грамотрицательных бактерий, грамположительных кокков и грибов рода *Candida* составляла 97, 94,5 и 43,5% соответственно, а среднее время их субкультивирования — 2,7, 3,9 и 5 ч соответственно. Результаты успешной идентификации микроорганизмов во всех случаях совпадали с результатами, полученными рутинным методом. При прямой идентификации монокомпонентных гемокультур корректно идентифицировано до вида 163 из 201 (81,1%) образца, при этом доля случаев успешной идентификации грамотрицательных, грамположительных микроорганизмов и грибов составила 94, 75,2 и 40% соответственно. Длительность масс-спектрометрического анализа, включая пробоподготовку, составила не более 1 ч. Суммарная доля случаев успешной идентификации монокомпонентных гемокультур ($n=141$) при сочетанном применении обоих ускоренных методов достигла 95%, в том числе 98,4% — для грамотрицательных бактерий, 96% — для грамположительных кокков и 50% — для грибов рода *Candida* (индекс каппы Козна при сравнении с рутинным методом — 0,92).

Вывод. Применение методов ускоренной идентификации положительных гемокультур с помощью MALDI-TOF MS позволяет быстро и надежно идентифицировать возбудителей бактериемии, что с использованием данных локального микробиологического мониторинга может способствовать раннему началу адекватной антибиотикотерапии.

Ключевые слова: бактериемия, гемокультура, быстрая идентификация, MALDI-TOF масс-спектрометрия.

Контактный адрес:
Дмитрий Александрович Попов
Эл. почта: da_popov@inbox.ru

Accelerated Techniques of Pathogen Identification from Positive Blood Cultures by MALDI-TOF Mass Spectrometry

D.A. Popov, E.A. Nadtochey, T.Yu. Vostrikova, S.T. Ovseenko

A.N. Bakoulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery, Moscow, Russia

Objective. To assess pathogen identification from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry.

Material and Methods. At the first stage, an in vitro study using MALDI-TOF MS and including 11 pathogen species (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*) was performed. This study involved hourly attempts to identify the above listed pathogens by MALDI-TOF MS (Vitek MS, bioMerieux) during incubation until their correct identification. At the second (clinical) stage, a total of 360 positive blood cultures obtained from 187 patients undergoing cardiac surgery were tested. Two accelerated techniques of pathogen identification from the positive blood cultures were studied concurrently with the routine method (MALDI-TOF MS assay following 24-hour incubation). A total of 300 blood samples (284 single cultures) were tested by the short-term incubation technique. A total of 211 blood samples (201 single cultures) were tested by the direct identification technique (with no culture on a solid medium). A total of 151 blood samples were tested by these two identification techniques concurrently.

Results. At the first stage, the incubation time (on blood agar) required to complete identification was no more than 5 hours and 6 hours for vials with polymer granules and vials with active charcoal, respectively. The incubation times for *Candida* spp. were 10 to 22 hours. The

identification by MALDI-TOF MS following short-term incubation on blood agar was successful for 259/284 (91.2%) of pathogens, including 97%, 94.5%, and 43.5% of Gram-negative rods, Gram-positive cocci, and *Candida* spp., respectively; the mean incubation times were 2.7, 3.9 and 5 hours, respectively. The results of successful pathogen identification coincided with those obtained by the routine method in all cases. The identification to species level by the direct MALDI-TOF MS assay was correct for 163/201 (81.1%) of pathogens, including 94%, 75.2%, and 40% of Gram-negative rods, Gram-positive cocci, and *Candida* spp., respectively. A turnaround time for this technique, including sample preparation, was no more than 1 hour. The concurrent use of the both accelerated techniques provided the overall successful identification in 95% of cases, including 98.4%, 96%, and 50% of Gram-negative rods, Gram-positive cocci, and *Candida* spp., respectively (Cohen's kappa for comparison with the routine method was 0.92).

Conclusion. The accelerated techniques of pathogen identification from blood cultures by MALDI-TOF MS provide rapid and reliable identification of microorganisms causing bacteremia, which in combination with local microbiological monitoring data may contribute to early appropriate antimicrobial therapy.

Key words: bacteremia, blood culture, rapid identification, MALDI-TOF mass spectrometry.

Введение

Несмотря на прогресс современной медицины, показатели заболеваемости и смертности от инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, остаются на высоком уровне [1]. Наиболее часто с проблемой инфекционных осложнений сталкиваются в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), в которых обычно сосредоточены наиболее тяжелые пациенты стационара, нуждающиеся в различных инвазивных методах лечения. Так, по данным масштабных многоцентровых исследований, до половины больных, находящихся в ОРИТ, могут иметь инфекционные осложнения [2, 3]. Быстрая диагностика инфекции и определение ее этиологии являются важными факторами, определяющими положительный исход заболевания: известно, что каждый час задержки назначения эффективной антибиотикотерапии при септическом шоке повышает риск летальности на 7,6% [4].

Одним из осложнений, а в части случаев основным, при ряде инфекций является бактериемия, то есть циркуляция живых микроорганизмов в кровяном русле, наблюдающаяся у 9–15% пациентов ОРИТ [2, 3]. На протяжении многих лет «золотым стандартом» диагностики бактериемии остается традиционный бактериологический метод. С введением в практику микробиологических лабораторий автоматических инкубаторов гемокультур и отказом от использования локально приготавливаемых питательных сред удалось значимо повысить качество выполнения данного исследования за счет увеличения чувствительности и специфичности метода, сокращения времени, необходимого для детекции роста патогенов, а также снижения трудоемкости процесса. Современные среды для гемокультуривирования обладают повышенными ростовыми свойствами, а также могут содержать специальные сорбенты, повышающие чувствительность исследо-

вания у пациентов, получающих антибиотики. При этом уже в первые сутки инкубации может быть выявлено порядка 95% положительных гемокультур [5].

После получения роста пробы крови обычно производится высеv первичной гемокультуры на плотные питательные среды для субкультивирования с последующей идентификацией полученных чистых культур (чаще всего по биохимическим признакам, с применением ручных или аппаратных тест-систем). При этом суммарные затраты времени на весь цикл исследования от момента взятия пробы крови до выдачи окончательного результата в среднем составляют порядка 3 суток.

С целью сокращения времени диагностики бактериемии все большее распространение получают некультуральные методы, основанные на принципах мультиплексного ПЦР-анализа, технологии микрочипов и др. Наряду со значимой экономией времени, данные методы характеризуются конечным набором идентифицируемых патогенов (определяется набором специфических праймеров или антител) и достаточно высокой стоимостью [6]. В связи с тем, что ПЦР может быть ингибирована гепарином, существуют определенные ограничения по применению методов на ее основе у больных, получающих данный препарат, рутинно используемый в интенсивной терапии [7].

Среди новых решений, позволяющих осуществлять ускоренную идентификацию возбудителей бактериемии и определять их чувствительность к антибиотикам, следует отметить систему Accelerate PHENO™ (Accelerate Diagnostics, Inc. США), которая основана на принципе мультиплексной флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и оригинальном методе анализа микроскопических изображений, которые позволяют отслеживать гибель микробных клеток в присутствии антибиотиков в режиме реального времени. Система анализирует первичную гемокультуру (материал из «проросшего» флакона). Очистка образца и все последующие этапы анализа происходят автоматически на борту прибора. Результат идентификации возбудителя доступен в среднем уже через 1–1,5 ч, еще через 5 ч можно получить данные антибиотикограммы. Нижний предел детекции составляет 10^4 КОЕ/мл. В настоящее время исследуются возможности применения метода для анализа, помимо первичных гемокультур, других субстратов (отделяемого дыхательных путей, спинномозговой жидкости, мочи, экссудата, тканевых биоптатов, а также цельной крови) [8]. Еще одной технологией «быстрой микробиологии», которая в перспективе может получить распространение в качестве метода

диагностики бактериемии, является магнитно-резонансное исследование цельной крови (без предварительного культивирования) при добавлении в образец парамагнитных частиц, аффинных в отношении тех или иных микроорганизмов-возбудителей (T2 Biosystems, США). В настоящее время разработана панель для детекции наиболее распространенных представителей дрожжеподобных грибов рода *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* и *C. glabrata*), позволяющая с высокой чувствительностью и специфичностью (96,4 и 99,4% соответственно) выявить фунгемию в течение 3–5 ч от момента начала исследования. Нижний предел детекции составляет всего 1 КОЕ/мл [9]. Ведутся разработки тест-систем для выявления других возбудителей.

В течение ряда лет исследовались возможности хроматографии и масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов. Ранее нами был предложен способ определения рода возбудителей бактериемии при анализе содержимого «положительного» флакона с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии. Данная методика путем качественного и количественного определения жирных кислот и альдегидов, а также их производных, входящих в состав клеточных стенок бактерий, позволяет определять родовую принадлежность микроорганизма-возбудителя в течение около 3 ч [10].

В настоящее время для ускорения идентификации возбудителей бактериемии перспективным представляется использование возможностей матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии — MALDI-TOF MS. Данный метод, основанный на дезинтеграции микробных клеток до белковых фрагментов с последующим сравнением полученных ионных спектров с эталонными, позволяет сократить время идентификации широкого спектра бактерий и грибов до нескольких минут при высокой достоверности результата. Применительно к рассматриваемой проблеме это означает сокращение времени идентификации бактериемии в среднем с 3 до 2 сут. Дальнейшее ускорение исследования возможно путем сокращения времени инкубации высева первичной гемокультуры, а также при применении специальных способов пробоподготовки, позволяющих проводить прямую идентификацию первичной гемокультуры, минуя этап субкультивирования.

Целью настоящей работы была оценка результатов ускоренных способов идентификации положительных гемокультур с применением метода MALDI-TOF MS в сравнении с рутинным методом.

Материал и методы

Исследование проведено в два этапа. На экспериментальном этапе для определения качественных и временных характеристик роста гемокультур различной этиологии и возможности их последующей ускоренной идентификации с помощью метода MALDI-TOF MS проведено модельное исследование *in vitro*, в которое было включено 11 различных видов микроорганизмов: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, коагулазонегативные стафилококки ([CoNS] *S. epidermidis* — $n=5$, *S. haemolyticus* — $n=5$), *E. faecalis*, *E. faecium*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis* (по 10 штаммов каждого вида — $n=100$). Суспензию микроорганизмов в концентрации, моделирующей таковую при бактериемии (10 КОЕ/мл), в 10 мл отбракованной по срокам годности стерильной донорской крови асептически вносили в парные флаконы для гемокультивирования, содержащие обогащенную питательную среду и различные сорбенты для антибиотиков: активный уголь (флаконы BacT/ALERT FA) и полимерные гранулы (флаконы BacT/ALERT FA Plus), после чего инкубировали их в аппарате BacT/ALERT 3D120 (bioMérieux, Франция). При этом в автоматическом режиме происходил мониторинг состояния индикатора, находящегося в дне флакона и реагирующего на нарастание концентрации углекислого газа, синтезируемого микроорганизмами в процессе своего роста. При изменении цвета индикатора инкубатор подавал сигнал, после чего производили высев культур на подогретый до температуры 37 °С кровяной агар. В процессе последующего субкультивирования ежедневно осуществлялись попытки идентификации культур с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра до получения корректных результатов.

На клиническом этапе работы выполнено исследование 360 положительных гемокультур от 187 кардиохирургических пациентов (162 взрослых и 25 детей) в возрасте от 1 недели до 82 лет. Работа выполнялась с использованием образцов, направляемых в лабораторию по назначениям лечащих врачей, и не предполагала дополнительных интервенционных вмешательств. Показаниями к исследованию крови на стерильность было наличие верифицированного очага инфекции или подозрение на него в сочетании с соответствующими клинико-лабораторными признаками системного воспаления. Образцы крови, взятые в асептических условиях из периферической вены, инкубировали по вышеописанной методике. После получения сигнала о наличии роста гемокультуры производилось

извлечение флаконов из инкубатора с окраской по Граму и микроскопическим исследованием их содержимого, высевом гемокультуры на плотные питательные среды и идентификацией суточных культур микроорганизмов с помощью MALDI-TOF MS (рутинный метод).

Идентификация возбудителей бактериемии после сокращенного субкультивирования первичной гемокультуры осуществлялась в 300 образцах. Параллельно с описанным выше рутинным методом проводили высев соответствующих положительных гемокультур на подогретый до температуры 37 °С кровяной агар. В процессе последующей инкубации при выявлении визуально определяемого роста выполняли попытки идентификации микроорганизмов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра. Максимальная длительность субкультивирования с учетом режима работы лаборатории была ограничена 6 ч.

Прямая (без субкультивирования) идентификация возбудителей бактериемии осуществлена в 211 образцах. Наряду с вышеописанным рутинным методом идентификации гемокультур выполняли пробоподготовку образцов из «положительных» флаконов, которая включала в себя предварительный этап осаждения крупнодисперсных примесей путем низкоскоростного центрифугирования (400 g, 0,5 мин), не приводящего к седиментации микроорганизмов. Далее 1 мл супернатанта помещали в микропробирку и добавляли 200 мкл 5% водного раствора сапонина для лизиса форменных элементов крови. Смесь инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, лизат центрифугировали (12 000 g, 1 мин), после чего удаляли супернатант. Осадок промывали 1 мл фосфатно-солевого буфера, затем смесь повторно центрифугировали (12 000 g, 1 мин) и удаляли супернатант. Далее к осадку добавляли сначала 300 мкл бидистиллированной воды для полного извлечения продуктов лизиса и после перемешивания — 900 мкл этанола, центрифугировали (12 000 g, 2 мин), удаляли супернатант, осадок подсушивали при комнатной температуре в течение нескольких минут, после чего к нему последовательно добавляли сначала 20 мкл муравьиной кислоты, затем равное количество ацетонитрила. Полученную суспензию перемешивали на вортексе в течение 10 с, после чего центрифугировали (12 000 g, 2 мин); 1 мкл экстракта подвергали масс-спектрометрическому анализу.

В работе использован MALDI-TOF масс-спектрометр Vitek MS (bioMérieux, Франция). Масс-спектры регистрировали в автоматическом режиме в диапазоне масс 2–20 kDa. Исследуемые образ-

цы (культуру микроорганизма или ее экстракт) в двух повторностях наносили на одноразовый слайд, добавляли раствор матрикса (α -циано-4-гидроксикоричная кислота) и высушивали при комнатной температуре. Далее заполненный слайд помещали в вакуумную камеру прибора, где под воздействием лазерного излучения образцы последовательно подвергались мягкой ионизации. Образующиеся при этом заряженные частицы двигались в электрическом поле к аноду-детектору со скоростью, пропорциональной их массе, формируя соответствующий масс-спектр. При сканировании каждого образца получали до 100 спектров. Идентификация микроорганизмов осуществлялась путем автоматического сравнения полученных масс-спектров с референсной базой данных, содержащей информацию о более чем 750 клинически значимых видах микроорганизмов.

Данные представлены в виде абсолютных значений и долей, а также среднего значения, минимума и максимума. Степень согласованности результатов, полученных с применением исследованных методик и традиционным методом, оценивалась с использованием индекса капшы Коэна.

Результаты

Этап I – модельный эксперимент

Среднее время с момента помещения инокулированных флаконов в инкубатор до подачи сигнала о наличии роста в модельном эксперименте составило 11,2 ч (от 8,2 до 16 ч) для грамотрицательных бактерий, 13,8 ч (от 9,6 до 25,4 ч) для грамположительных бактерий и 28,7 ч (от 16,8 до 36 ч) для дрожжеподобных грибов (табл. 1). Индикация роста микроорганизмов во флаконах, в которых в качестве

сорбента использовались полимерные гранулы, происходила раньше, чем во флаконах, содержащих активный уголь. При этом временная разница в среднем составила 1,6 ч для грамотрицательных, 2,1 ч – для грамположительных микроорганизмов и 0,55 ч – для грибов рода *Candida*.

Время субкультивирования тестируемых бактериальных культур на кровяном агаре, потребовавшееся для их полной идентификации с помощью метода MALDI-TOF MS, не превышало 5 ч для флаконов с полимерными гранулами и 6 ч при использовании флаконов с активным углем. Соответствующие показатели для дрожжеподобных грибов были существенно выше и составили 10 и 11 ч для *C. parapsilosis* и 21 и 22 ч для *C. albicans* соответственно. Данные представлены на рис. 1, а-д. Следует отметить, что в течение первых 20 ч субкультивирования в 2 из 10 (20%) случаев *C. albicans* были ошибочно идентифицированы как *Geotrichum fermentans*.

Этап II – исследование клинических образцов

Среднее время индикации роста микроорганизмов у больных с бактериемией составило 19 ч (от 4 до 96 ч). При этом сигнал о наличии роста грамотрицательных микроорганизмов подавался в среднем через 13 ч (от 4 до 68 ч), грамположительных – через 19 ч (от 6 до 86 ч), дрожжеподобных грибов – через 44 ч (от 22 до 96 ч). Суммарно в первые сутки инкубации был выявлен рост 87% положительных гемокультур (рис. 2).

Метод ускоренной идентификации гемокультур после их сокращенного субкультивирования. По данным микроскопического исследования содержимого «проросших» флаконов, 284 из 300 образцов были

Таблица 1. Время инкубации экспериментальных гемокультур до момента детекции роста микроорганизмов (по 10 штаммов каждого вида, n=100)

| Микроорганизмы | Флаконы с сорбентом в виде активного угля | Флаконы с сорбентом в виде полимерных гранул |
|----------------------------|--|---|
| | время детекции роста, ч [М (min-max)] | |
| Грамотрицательные бактерии | <i>P. aeruginosa</i> | 14 (12,5–15,1) |
| | <i>E. coli</i> | 12,5 (11–14,2) |
| | <i>A. baumannii</i> | 11,1 (9,6–16) |
| | <i>K. pneumoniae</i> | 10 (8,5–11,3) |
| Грамположительные кокки | CoNS | 19,8 (12–25,4) |
| | <i>E. faecium</i> | 15,3 (11,5–22,3) |
| | <i>S. aureus</i> | 12,2 (11–14) |
| | <i>E. faecalis</i> | 12 (10,8–13,2) |
| Грибы | <i>C. albicans</i> | 30,8 (20,8–36) |
| | <i>C. parapsilosis</i> | 27,8 (16,8–35,5) |

монокомпонентными. После сокращенной инкубации на кровяном агаре методом MALDI-TOF MS было идентифицировано 259 из 284 (91,2%) образцов. Доля успешной идентификации грам-отрицательных и грамположительных бактерий, а также дрожжеподобных грибов при максимальной длительности инкубации до 6 ч составила 97, 94,5 и 43,5% соответственно (табл. 2). Среднее время субкультивирования грамотрицательных, грамположительных бактерий и грибов рода *Candida* составило 2,7 ч, 3,9 ч и 5 ч соответственно. Полученные результаты полностью совпали с результатами рутинного метода, которые становились доступными на следующий рабочий день.

Не удалось идентифицировать 25 (8,8%) образцов, которые рутинным методом были опреде-

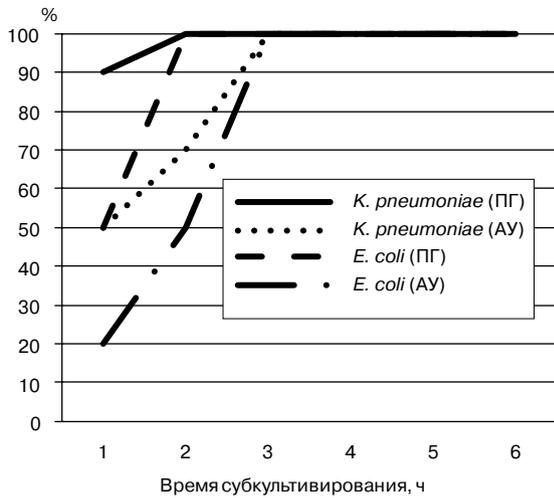


Рис. 1, а. Частота успешной идентификации энтеробактерий с помощью MALDI-TOF MS в зависимости от длительности субкультивирования экспериментальных гемокультур. Здесь и на рис. 1, б–д: ПГ — флаконы с сорбентом в виде полимерных гранул; АУ — флаконы с сорбентом в виде активного угля.

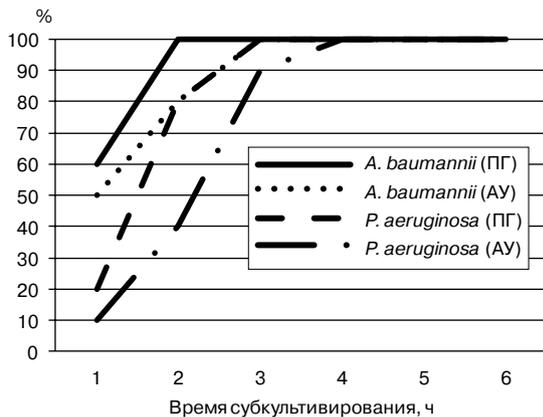


Рис. 1, б. Частота успешной идентификации неферментирующих грамотрицательных бактерий с помощью MALDI-TOF MS в зависимости от длительности субкультивирования экспериментальных гемокультур.

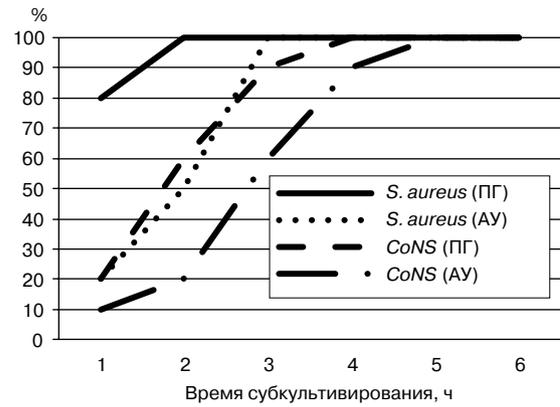


Рис. 1, в. Частота успешной идентификации стафилококков с помощью MALDI-TOF MS в зависимости от длительности субкультивирования экспериментальных гемокультур.

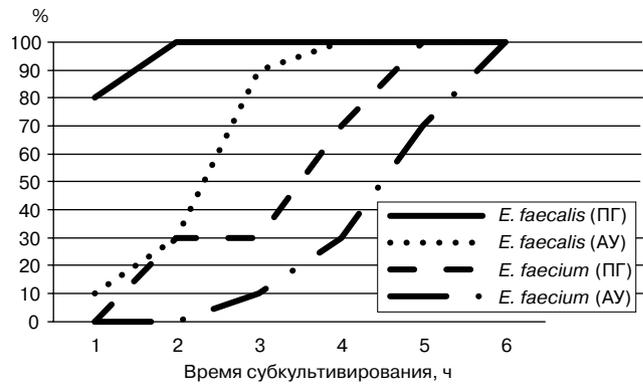


Рис. 1, г. Частота успешной идентификации энтерококков с помощью MALDI-TOF MS в зависимости от длительности субкультивирования экспериментальных гемокультур.

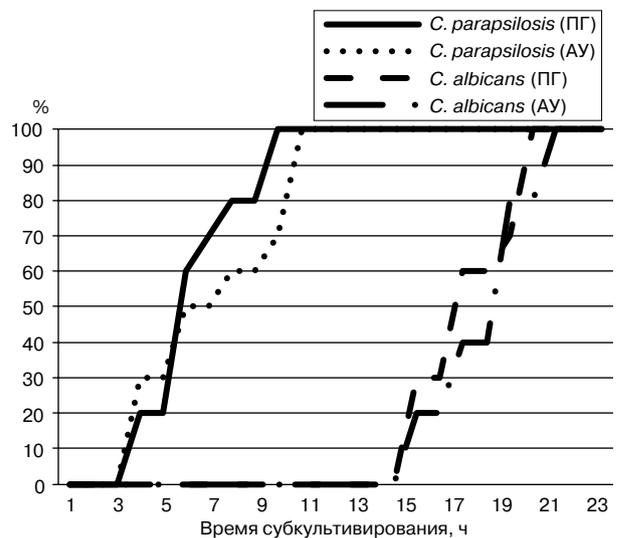


Рис. 1, д. Частота успешной идентификации грибов рода *Candida* с помощью MALDI-TOF MS в зависимости от длительности субкультивирования экспериментальных гемокультур.

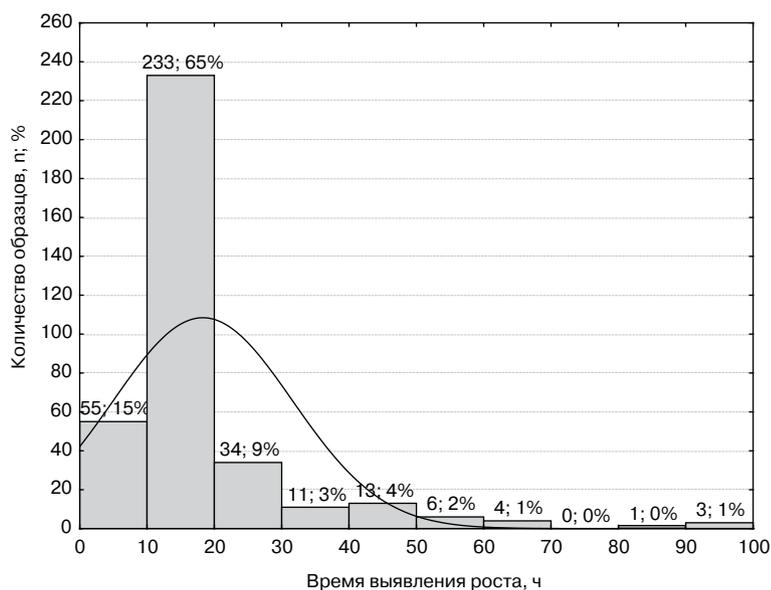


Рис. 2. Частота положительных результатов в зависимости от времени инкубации гемокультур, $n=360$.

лены как дрожжеподобные грибы рода *Candida* ($n=13$), *S. epidermidis* ($n=6$), *S. marcescens* ($n=2$), *S. aureus* ($n=1$), *S. haemolyticus* ($n=1$), *S. hominis* ($n=1$) и *P. mirabilis* ($n=1$).

Среди включенных в исследование образцов было 16 смешанных культур (ассоциации из двух микроорганизмов), которые также были подвергнуты масс-спектрометрическому анализу. При этом в 13 (81%) случаях до вида был определен один, еще в 1 случае — оба микроорганизма из ассоциации (за счет постановки теста в двух повторностях). Результат идентификации отсутствовал в 2 случаях (табл. 3).

Ускоренная идентификация гемокультур с помощью метода прямой MALDI-TOF масс-спектрометрии. При прямой идентификации монокомпонентных гемокультур (201 из 211) корректно идентифицировано до вида 163 (81,1%) образца, при этом доля успешных идентификаций грамотрицательных бактерий, грамположительных кокков и грибов была 94, 75,2 и 40% соответственно (табл. 4). В 18 из 201 (9%) образца результат идентификации отсутствовал. Еще в 20 из 201 (10%) случая имело место расхождение полученных результатов с рутинным методом, причем в группе коагулазонегативных стафилококков в половине случаев наблюдалось несоответствие на уровне вида, не имевшее клинического значения (табл. 5).

Среди включенных в исследование образцов было 10 смешанных культур (ассоциации из двух микроорганизмов). При их анализе методом MALDI-TOF MS в 7 (70%) случаях был определен

до вида один микроорганизм из ассоциации, в 2 случаях имела место корректная идентификация обоих микроорганизмов (за счет постановки теста в двух повторностях); в одной пробе результат получен не был (см. табл. 3). Временные затраты на проведение масс-спектрометрического анализа, включая пробоподготовку, составляли не более 1 ч.

В 151 случае идентификацию проводили одновременно двумя ускоренными методами с применением MALDI-TOF MS. При этом в монокомпонентных гемокультурах ($n=141$) суммарная доля успешных идентификаций достигла 134 из 141 (95%) — 61 из 62 (98,4%) для грамотрицательных бактерий, 70 из 73 (96%) для грамположительных кокков и 3 из 6 (50%) для дрожжеподобных грибов. При сравнении результатов сочетанного применения обеих методик с рутинным методом индекс капши Коэна составил 0,92,

что свидетельствует о высокой степени их согласованности.

Обсуждение

Быстрое получение результатов микробиологического обследования больных является важным условием повышения эффективности лечения и улучшения его результатов [4]. Внедрение метода MALDI-TOF MS в клиническую практику явилось, без преувеличения, настоящим прорывом в направлении ускорения этиологической диагностики бактериальных и грибковых инфекций [5,11–13].

Объем биомассы микроорганизмов, необходимый для исследования с помощью метода MALDI-TOF MS, весьма невелик. Это в ряде случаев дает возможность идентификации «молодых» культур. Такой подход не требует специальной пробоподготовки и легко реализуем на практике. Данные литературы свидетельствуют о его высокой эффективности: так, в работе Е. А. Idelevich с соавт. показано, что среднее время субкультивирования с момента посева первичной гемокультуры на подогретый кровяной агар до успешной идентификации с помощью MALDI-TOF MS составило 2 ч для грамотрицательных бактерий и 5,9 ч для грамположительных кокков. Всего в течение первых 6 ч субкультивирования было корректно идентифицировано 64,5% образцов (97,6% грамотрицательных бактерий и 64% грамположительных кокков) [14]. В исследовании R. Kohlmann с соавт. доля успешной идентификации с помощью MALDI-TOF MS положительных культур ($n=325$) после их субкультивирования

Таблица 2. Результаты идентификации гемокультур методом MALDI-TOF MS после сокращенного субкультивирования, $n=284$

| Микроорганизмы | n | Успешная идентификация, n (%) | Время субкультивирования, ч [М (min-max)] |
|-------------------------------------|-----|---------------------------------|---|
| Грамположительные | 163 | 154 (94,5) | 3,9 (3–6) |
| Стафилококки | 118 | 109 (92,4) | 3,9 (3–6) |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 56 | 51 | 4 (3–6) |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 32 | 30 | 4 (3–6) |
| <i>Staphylococcus hominis</i> | 17 | 16 | 4 (3–6) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 13 | 12 | 3,2 (3–4) |
| Энтерококки | 32 | 32 (100) | 3,7 (3–4,5) |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 16 | 16 | 3,8 (3–4,5) |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 16 | 16 | 3,6 (3–4,5) |
| Прочие грамположительные | 13 | 13 | 4 (3–6) |
| Грамотрицательные | 98 | 95 (97) | 2,7 (1,5–5,5) |
| Энтеробактерии | 65 | 62 (95,4) | 2,5 (1,5–5,5) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 40 | 40 | 2,1 (1,5–3) |
| <i>Serratia marcescens</i> | 13 | 11 | 3,7 (2–5,5) |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 6 | 6 | 2,7 (2–4) |
| <i>Escherichia coli</i> | 4 | 4 | 2,5 (1,5–3) |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 1 | 1 | 4 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 1 | 0 | 6 |
| Неферментирующие | 33 | 33 (100) | 2,9 (1,5–5) |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 15 | 15 | 2,6 (1,5–3) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 10 | 10 | 3 (2–5) |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 7 | 7 | 3,4 (2–5) |
| <i>Delftia acidovorans</i> | 1 | 1 | 4 |
| Грибы | 23 | 10 (43,5) | 5 (4–6) |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 18 | 9 | 5,2 (4–6) |
| <i>Candida albicans</i> | 5 | 1 | 5,4 (5–6) |
| ВСЕГО | 284 | 259 (91,2) | 3,6 (1,5–6) |

в течение 4 ч на шоколадном агаре составила 69,5% (97,6% для грамотрицательных бактерий и 64,8% для грамположительных кокков). При исследовании полимикробных культур ($n=52$) в 72,7% случаев был успешно идентифицирован один микроорганизм из ассоциации. Грамположительные палочки удалось идентифицировать только в 1 из 25 образцов; грибы не были определены ни в одном из 4 случаев, что является ожидаемым при столь коротком времени инкубации [15].

По результатам проведенного нами модельного эксперимента установлено, что среднее время субкультивирования, достаточное для успешной идентификации гемокультур методом MALDI-TOF MS, в целом меньше для грамотрицательных бактерий (2,5 ч), чем для грамположительных кокков (3,5 ч)

и особенно таких медленно растущих микроорганизмов, как грибы рода *Candida* (>10 ч), что полностью согласуется с приведенными выше данными литературы.

Принцип метода MALDI-TOF MS применительно к идентификации микроорганизмов (детектирование спектра константных белков «домашнего хозяйства») позволяет использовать для анализа не только чистые культуры бактерий и грибов, но и специальным образом полученные экстракты из содержащих микроорганизмы сред (в частности первичных гемокультур). При этом возможно исключить из цепочки исследования биоматериала ранее обязательный этап получения чистых культур микроорганизмов в виде отдельных колоний на плотных питательных средах, что приводит к суще-

Таблица 3. Результаты идентификации микробных ассоциаций в гемокультурах двумя ускоренными методами с помощью MALDI-TOF MS

| Рутинный метод | Идентификация после сокращенного субкультивирования (n=16) | Прямая идентификация (n=10) |
|--|--|--|
| <i>A. baumannii</i> + <i>E. faecalis</i> | <i>A. baumannii</i> | <i>A. baumannii</i> |
| <i>A. baumannii</i> + <i>E. faecalis</i> | <i>A. baumannii</i> | <i>A. baumannii</i> |
| <i>S. marcescens</i> + <i>E. faecalis</i> | <i>S. marcescens</i> | <i>S. marcescens</i> |
| <i>E. cloacae</i> + <i>K. pneumoniae</i> | <i>E. cloacae</i> | <i>E. cloacae</i> |
| <i>E. faecium</i> + <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. faecium</i> | <i>E. faecium</i> |
| <i>E. faecalis</i> + <i>E. faecium</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>E. faecalis</i> |
| <i>K. pneumoniae</i> + <i>A. baumannii</i> | <i>A. baumannii</i> | <i>A. baumannii</i> |
| <i>A. baumannii</i> + <i>E. faecalis</i> | <i>A. baumannii</i> | <i>A. baumannii</i> + <i>E. faecalis</i> |
| <i>A. baumannii</i> + <i>E. faecium</i> | <i>A. baumannii</i> | <i>A. baumannii</i> + <i>E. faecium</i> |
| <i>S. marcescens</i> + <i>E. faecium</i> | <i>S. marcescens</i> | Нет идентификации |
| <i>A. baumannii</i> + <i>E. faecium</i> | <i>E. faecium</i> | Не исследовалось |
| <i>E. faecium</i> + <i>S. epidermidis</i> | <i>E. faecium</i> | Не исследовалось |
| <i>E. faecalis</i> + <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | Не исследовалось |
| <i>A. baumannii</i> + <i>E. faecium</i> | <i>A. baumannii</i> + <i>E. faecium</i> | Не исследовалось |
| <i>A. baumannii</i> + <i>S. haemolyticus</i> | Нет идентификации | Не исследовалось |
| <i>A. baumannii</i> + <i>S. epidermidis</i> | Нет идентификации | Не исследовалось |

ственной экономии времени. Непосредственный анализ содержимого флаконов с положительной гемокультурой не представляется возможным из-за наличия различных примесей, с целью удаления которых необходимо проведение соответствующей пробоподготовки, обычно включающей в себя несколько последовательных этапов (лизис форменных элементов крови, центрифугирование, отмывка осадка микроорганизмов, экстракция белков) [5, 16, 17]. Описаны также методы, позволяющие выделить микроорганизмы с помощью фильтрации, центрифугирования первичной гемокультуры в пробирках, содержащих гель для отделения примесей, и др. [18]. Сложившаяся практика показывает, что в лабораториях, применяющих метод прямого MALDI-TOF MS-анализа положительных гемокультур, в процессе работы обычно производится модификация взятой на начальном этапе за основу той или иной схемы пробоподготовки, что позволяет адаптировать метод к местным условиям и достичь наилучших результатов. В настоящее время также доступны коммерческие наборы реагентов, которые обеспечивают проведение пробоподготовки в оптимальных условиях.

Согласно нашим ранее опубликованным данным, доля успешной идентификации положительных гемокультур методом прямого MALDI-TOF MS-анализа составила 76,1%, причем грамтри-

цательные бактерии идентифицировались корректно чаще, чем грамположительные кокки (85,4 и 69,1% соответственно, $p=0,01$). В случае грибов был идентифицирован один образец из двух [5]. Накопленный опыт позволил нам несколько улучшить эти показатели: по данным настоящего исследования, указанным методом было корректно идентифицировано 81,1% положительных гемокультур (94% грамотрицательных бактерий, 75,2% грамположительных кокков и 40% грибов).

Прямой (без субкультивирования) MALDI-TOF MS-анализ положительных гемокультур по сравнению с методом их сокращенной инкубации в целом характеризуется несколько меньшей частотой успешных идентификаций, а также требует специального обучения лаборантов и дополнительных (пусть небольших) затрат на химические реагенты и расходные материалы [11]. При этом он может дать определенный выигрыш во времени, что особенно актуально в случаях фунгемий. Для улучшения результатов идентификации микроорганизмов данным методом необходима дальнейшая оптимизация способов пробоподготовки.

Метод сокращенного субкультивирования первичных гемокультур занимает несколько больше времени по сравнению с прямым методом, однако дает более высокий процент успешной идентификации бактериальных культур. В то же время, при-

Таблица 4. Результаты прямой идентификации гемокультур с помощью метода MALDI-TOF MS, n=201

| Микроорганизмы | n | Успешная прямая идентификация, n (%) |
|-------------------------------------|-----|--------------------------------------|
| Грамположительные | 109 | 82 (75,2) |
| Стафилококки | 73 | 52 (71,2) |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 34 | 24 |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 21 | 15 |
| <i>Staphylococcus hominis</i> | 12 | 8 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 5 | 4 |
| <i>Staphylococcus capitis</i> | 1 | 1 |
| Энтерококки | 21 | 19 (90,5) |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 11 | 11 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 10 | 8 |
| Прочие грамположительные | 15 | 11 (73,3) |
| Грамотрицательные | 82 | 77 (94) |
| Энтеробактерии | 51 | 50 (98) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 28 | 28 |
| <i>Serratia marcescens</i> | 12 | 12 |
| <i>Escherichia coli</i> | 5 | 5 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 4 | 4 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 2 | 1 |
| Неферментирующие | 31 | 27 (87) |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 15 | 13 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 9 | 8 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 6 | 5 |
| <i>Delftia acidovorans</i> | 1 | 1 |
| Грибы | 10 | 4 (40) |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 6 | 2 |
| <i>Candida albicans</i> | 3 | 2 |
| <i>Candida glabrata</i> | 1 | 0 |
| ИТОГО | 201 | 163 (81,1) |

менение данной методики ограничено для медленно растущих микроорганизмов (например, грибов рода *Candida*), для идентификации которых лучше воспользоваться методом прямой идентификации с помощью MALDI-TOF MS.

Совместное использование обоих экспресс-методов позволяет дополнительно повысить долю успешного определения возбудителей бактериемии. Следует отметить, что это не приводит к значимому росту расходов лаборатории, так как идентификация микроорганизмов с помощью MALDI-TOF MS по сравнению с культуральным методом является практически «бесплатной».

Штатное программное обеспечение MALDI-TOF MS рассчитано на идентификацию чистых

культур микроорганизмов. Тем не менее, в нашем исследовании в значительном количестве случаев был корректно определен один микроорганизм из ассоциации (81% — после сокращенного субкультивирования и 70% — при использовании прямого метода). В одном случае после краткосрочного субкультивирования и в двух при прямой идентификации были идентифицированы оба микроорганизма за счет повторностей. С целью полноценной экспресс-диагностики бактериемий, вызванных ассоциацией микроорганизмов, перспективным может оказаться рассев первичной гемокультуры на селективные и/или хромогенные питательные среды с последующей их сокращенной инкубацией и идентификацией с помощью MALDI-TOF MS.

Таблица 5. Случаи расхождения результатов прямой идентификации гемокультур с помощью MALDI-TOF MS в сравнении с рутинным методом, n=20

| № п/п | Прямая идентификация | Рутинный метод |
|-------|------------------------------------|------------------------------------|
| 1 | <i>Abiotrophia defectiva</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| 2 | <i>Bacillus licheniformis</i> | <i>Staphylococcus hominis</i> |
| 3 | <i>Bacillus licheniformis</i> | <i>Streptococcus constellatus</i> |
| 4 | <i>Brevi bacillus</i> | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| 5 | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida glabrata</i> |
| 6 | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida parapsilosis</i> |
| 7 | <i>Candida lusitanae</i> | <i>Candida parapsilosis</i> |
| 8 | <i>Cryptococcus terreus</i> | <i>Candida parapsilosis</i> |
| 9 | <i>Debaryomyces etchellsii</i> | <i>Candida albicans</i> |
| 10 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Proteus mirabilis</i> |
| 11 | <i>Kytococcus sedentarius</i> | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> |
| 12 | <i>Listeria grayi</i> | <i>Enterococcus faecium</i> |
| 13 | <i>Mycobacterium kansasii</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| 14 | <i>Staphylococcus capitis</i> | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> |
| 15 | <i>Staphylococcus capitis</i> | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> |
| 16 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | <i>Staphylococcus hominis</i> |
| 17 | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | <i>Staphylococcus hominis</i> |
| 18 | <i>Staphylococcus hominis</i> | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> |
| 19 | <i>Staphylococcus hominis</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| 20 | <i>Streptococcus mitis/oralis</i> | <i>Streptococcus sanguis</i> |

Идентифицированные после сокращенной инкубации монокультуры микроорганизмов при наличии достаточного количества биомассы могут быть использованы для определения их антибиотикограммы, например с помощью автоматических микробиологических анализаторов. Имеющиеся в литературе данные указывают на высокую эффективность такого подхода [19].

Таким образом, применение методов ускоренной идентификации положительных гемокультур с помощью MALDI-TOF MS позволяет быстро и достаточно надежно идентифицировать возбудителей бактериемий. Ранняя идентификация этиологически значимых микроорганизмов при использо-

вании результатов локального микробиологического мониторинга обеспечивает возможность назначения адекватной антибиотикотерапии в кратчайшие сроки, что может способствовать улучшению результатов лечения больных как в клиническом, так и в экономическом аспектах [20]. В связи с этим, рассмотренные ускоренные методы идентификации положительных гемокультур как альтернативно, так и в параллели целесообразно включать в рутинную работу современных микробиологических лабораторий.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ № МД-6572.2016.7.

Литература

- Magill S.S., Edwards J.R., Bamberg W., et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care-Associated Infections. *New Engl J Med* 2014; 370:1198-208.
- Vincent J.L., Rello J., Marshall J. and EPIC II Group of Investigators. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 2009; 302(21): 2323-9.
- Руднов В.А., Бельский Д.В., Дехнич А.В., исследовательская группа РИОРИТа. Инфекции в ОРИТ России: результаты национального многоцентрового исследования. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2011; 4:294-303.

4. Kumar A., Roberts D., Wood K.E., et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *J Crit Care Med* 2006; 34 (6):1589-96.
5. Попов Д.А., Овсенко С.Т., Вострикова Т.Ю. Экспресс-идентификация положительных гемокультур с помощью метода прямой MALDI-ToF масс-спектрометрии. *Анестезиология и реаниматология* 2015; 5:71-5.
6. Попов Д.А., Вострикова Т.Ю. Первый опыт применения метода ПЦР в режиме реального времени для диагностики бактериемии в послеоперационном периоде у кардиохирургических больных. *Клиническая лабораторная диагностика* 2011; 8:49-52.
7. Костюк С.А., Кулага О.К., Хворик Д.Ф. Новые аспекты клинического применения полимеразной цепной реакции. *Медицинские новости* 2006; 5:14-18.
8. Price C., Douglas I., Tuttle E., et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of bacteria in bloodstream infections using the Accelerate ID/AST technology. *ECCMID* 2015; EV0493.
9. Pfaller M.A., Wolk D.M., Lowery T.J. T2MR and T2Candida: novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis. *Future Microbiology* 2016; 11(1):103-17.
10. Попов Д.А., Овсенко С.Т., Осипов Г.А., Вострикова Т.Ю. Ускоренный способ идентификации возбудителей бактериемий с применением метода газовой хромато-масс-спектрометрии. *Клиническая лабораторная диагностика* 2013;5: 54-8.
11. Lagacé-Wiens P.R., Adam H.J., Karlowsky J.A., et al. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. *J Clin Microbiol* 2012; 50:3324-8.
12. Patel R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass-spectrometry in clinical microbiology. *J Clin Infect Dis* 2013; 57: 564-72.
13. Wieser A., Schneider L., Jung J., Schubert S. MALDI-ToF MS in microbiological diagnostics – identification of microorganisms and beyond (mini review). *J Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 93:965-74.
14. Idelevich E.A., Schule I., Grunastel B., Wullenweber J., Peters G., Becker K. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *J Clin Microbiol Infect* 2014; 20(10):1001-6.
15. Kohlmann R., Hoffmann A., Geis G., Gatermann S. MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. *Int J Med Microbiol* 2015; 305 (4-5):469-79.
16. Christner M., Rohde H., Wolters M., Sobottka I., Wegscheider K., Aepfelbacher M. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol* 2010; 48(5):1584-91.
17. Spanu T., Posteraro B., Fiori B., et al. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2012; 50(1):176-9.
18. Schmidt V., Jarosch A., März P., Sander C., Vacata V., Kalka-Moll W. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 31(3):311-7.
19. Idelevich E.A., Grünastel B., Peters G., Becker K. Direct blood culturing on solid medium outperforms an automated continuously monitored broth-based blood culture system in terms of time to identification and susceptibility testing. *J New microbes and new infections* 2015; 10:19-24.
20. Попов Д.А., Вострикова Т.Ю. Микробиологический мониторинг в кардиохирургическом стационаре – опыт за 10 лет. *Бюллетень НИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания»* 2012; 5:68-76.