

Результаты идентификации бактерий из положительных гемокультур пациентов многопрофильного стационара с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии

Аmineva П.Г.¹, Руднов В.А.^{2,3}, Кармацких О.Г.¹, Невская Н.Н.³, Бельский Д.В.³, Иванова Н.А.³

¹ ООО «КволиитиМед», Екатеринбург, Россия

² ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

³ МАУ «Городская клиническая больница №40», Екатеринбург, Россия

Контактный адрес:

Владимир Александрович Руднов
Эл. почта: vrudnov@mail.ru

Ключевые слова: бактериемия, гемокультура, ускоренная идентификация, масс-спектрометрия.

Цель. Оценить результаты ускоренной идентификации микроорганизмов, выделенных из положительных гемокультур, полученных от пациентов различных отделений крупного многопрофильного стационара, с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) и сопоставить их с классическими культуральными методами.

Материалы и методы. В период с 2017 по 2018 гг. в исследование вошло 109 положительных гемокультур от 73 пациентов МАУ ГКБ №40 в возрасте от 1 года до 83 лет. Образцы крови были взяты в асептических условиях из двух периферических вен по стандартному протоколу в 12 отделениях ЛПУ. Идентификацию микроорганизмов производили 2 методами: фенотипическим (с использованием автоматического бактериологического анализатора Vitek 2 (BioMerieux, Франция), биохимических тестов, окраски по Граму, теста на каталазу, оксидазу, латекс-агглютинации) в лаборатории микробиологии и методом MALDI-TOF MS на анализаторе Vitek MS (BioMerieux, Франция) в лаборатории «QualityMed». Транспортировка крови из ЛПУ в лабораторию осуществлялась с помощью курьера, время доставки варьировало от 7 ч. до 2 суток. Из исследования были исключены полимикробные гемокультуры (4 флакона), случаи фунгемии (4 флакона), а также 1 флакон из-за поздних сроков доставки.

Результаты. Всего из 100 флаконов, включенных в исследование, было выделено 70 штаммов грамположительных и 29 штаммов грамотрицательных бактерий. Еще 1 штамм *Streptococcus pneumoniae* не был получен в культуре из-за явления аутолиза. В целом, процент успешной ускоренной идентификации по всем группам бактерий составил 86,0%, при этом для грамотрицательных палочек он достигал 100%, для грамположительных кокков – 83,5%.

Выводы. Применение методов ускоренной идентификации положительных гемокультур с помощью MALDI-TOF MS позволяет быстрее и надежнее определять возбудителей грамотрицательных бактериемий. Эффективность ускоренной детекции грамположительных кокков снижается до 83,5%.

The results of identification of bacteria from positive blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry

Amineva P.G.¹, Rudnov V.A.^{2,3}, Karmatskikh O.G.¹, Nevskaya N.N.³, Belsky D.V.³, Ivanova N.A.³

¹ "QualityMed", Yekaterinburg, Russia

² Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

³ City Clinical Hospital №40, Yekaterinburg, Russia

Contacts:

Vladimir A. Rudnov
E-mail: vrudnov@mail.ru

Key words: bacteremia, blood culture, accelerated identification, mass spectrometry.

Objective. To evaluate the results of accelerated identification of microorganisms isolated from positive hemocultures obtained from patients of various departments of a large multi-profile hospital by MALDI-TOF MS and to compare them with classical cultural methods.

Materials and methods. In the period from 2017 to 2018, the study included 109 positive blood cultures from 73 patients from UIA GKB number 40 at the age of 1 to 83 years. Blood samples were taken in aseptic conditions from 2 peripheral veins according to the standard protocol in 12 departments of the health facility. Identification of the grown up colonies was carried out by 2 methods: phenotypic (using the automatic bacteriological analyzer Vitek 2 (BioMerieux, France), biochemical tests, Gram stain, catalase test, oxidase, latex agglutination) in the laboratory of microbiology and MALDI-TOF MS on the Vitek MS analyzer (BioMerieux, France) in the QualityMed laboratory. The transportation of blood from the health facility to the laboratory was carried out with the help of a courier, the delivery time varied from 7 hours to 2 days. Polymicrobial hemocultures (4 vials), cases of fungemia (4 vials), and also 1 vial because of late delivery times are excluded from the study.

Results. In total, out of 100 vials included in the study, 70 strains of Gram-positive bacteria and 29 strains of Gram-negative bacteria were isolated. Another 1 strain of *Streptococcus pneumoniae* was not obtained in culture due to the phenomenon of autolysis. In general, the percentage of successful accelerated identification for all groups of bacteria was 86.0%, and for gram-negative rods it reached 100%, for gram-positive cocci – 83.5%.

Conclusions. The use of methods for accelerated identification of positive blood cultures with MALDI-TOF MS allows faster and reliable detection of pathogens of gram-negative bacteremia. The effectiveness of detection of gram-positive cocci is reduced to 83.5%.

Введение

К настоящему времени накопилось немало доказательств клинической пользы ранней диагностики тяжелых инфекций и определения их этиологии [1-5]. Одной из технологий, позволяющей ускорить диагностику бактериемии, является время пролетная матрично-ассоциированная лазерная десорбционная ионизационная масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS). В настоящее время она принята как новый стандарт идентификации микроорганизмов в некоторых биологических средах и теперь применяется в микробиологических лабораториях во многих странах мира [6]. Технология MALDI-TOF MS использует мягкую лазерную десорбцию для того, чтобы ионизировать структурные элементы (главным образом, белки рибосом) бактерий и грибов, а затем разделять молекулы по их массе. В 2009 г. Stevenson и соавт. опубликовали первое сообщение об успешной идентификации микроорганизмов взятых напрямую из положительных флаконов крови [7]. MALDI-TOF MS ранее не использовалась для идентификации непосредственно из положительных флаконов крови в силу того, что для получения приемлемого спектра необходима высокая плотность микроорганизмов, а также потому, что гемоглобин и протеины сыворотки искажают интерпретацию белкового спектра бактерий. С целью повышения надежности диагностики, авторы использовали пробирки с гелем, с помощью которого добивались разделения клеточных элементов крови, белков и сыворотки. При этом для исследования собирался осадок бактериальных клеток, находящийся на поверхности геля. Затем выполнялась экстракция протеинов с помощью добавления муравьиной кислоты и ацетонитрила. Использование этой методики в работе с положительными гемокультурами позволило добиться успешной идентификации микроорганизмов в 75,8% случаев.

В последующее десятилетие данная методика получила развитие, но, в отсутствие общепризнанного стандартизированного подхода, появилось много «домашних» методов: лизис-фильтрация [8, 9], центрифугирование [10, 11], сапонин-метод [12, 13, 14] и коммерческий набор MALDI Sepsityper kit (Bruker Daltonics, Германия) [15]. Проведенные к настоящему времени в РФ исследования касались двух достаточно узких категорий пациентов: новорожденные и пациенты после кардиохирургических вмешательств, имеющих достаточно специфичную этиологическую структуру [11, 14, 16]. Кроме того, у пациентов после кардиохирургических операций развивалась исключительно нозокомиальная инфекция, со своими локальными особенностями конкретного лечебного учреждения. Между тем, удельный вес кардиохирургических больных в общей популяции лиц, перенесших оперативные вмешательства, достаточно ограничен. При исследовании новорожденных применялся метод ПЦР, где в качестве диагностических зондов использовались праймеры только для 8 родов и 11 видов бактерий. Очевидно, что вынесение более убедительных заключений об информационной значимости методики при такой ограниченной популяции пациентов и ее реализации в высоко оснащенных лабораториях страны, а также скромном наборе диагностических

возможностей не является возможным. Отсутствие официальной регистрации метода для идентификации бактерий из гемокультур в России служит дополнительным мотивом для активного продолжения исследований среди более широкого спектра микроорганизмов с целью оценки его клинической пользы.

Цель исследования: оценить результаты ускоренной идентификации микроорганизмов, выделенных из положительных гемокультур, полученных от пациентов различных отделений крупного многопрофильного стационара, с помощью MALDI-TOF MS и сопоставить их с результатами классических культуральных методов.

Материалы и методы

Взятие крови у пациентов для культурального исследования проводилось в Муниципальном автономном учреждении «Городская клиническая больница №40» Екатеринбурга (МАУ ГКБ №40) в 2017-2018 гг. МАУ ГКБ №40 является крупным многопрофильным стационаром Екатеринбурга, в котором развернуто 1506 коек в составе 47 подразделений, где ежегодно получают лечение более 50 тыс. человек. Всего выполнено исследование 109 положительных гемокультур от 73 пациентов в возрасте от 1 года до 83 лет. Из них детей – 2 и взрослых 71 человек. Сорок один (56,16%) человек были пациентами трех отделений реанимации (поливалентной, нейрохирургической, инфекционной). Образцы крови были взяты в асептических условиях из периферической вены по стандартному протоколу в 12 отделениях ЛПУ. Кровь доставлялась в лабораторию микробиологии МАУ ГКБ №40 сразу после ее взятия. Показанием к исследованию крови на стерильность было наличие верифицированного очага или подозрение на него в сочетании с признаками остро возникшей органной дисфункции, связанной с инфекцией. Наличие органно-системной дисфункции и ее тяжесть определялись согласно значениям шкалы SOFA [17]. Флаконы с кровью инкубировали в анализаторах гемокультур BacT/ALERT 3D120 (BioMérieux, Франция) и BACTEC (Becton Dickinson, США). После сигнала прибора о росте микроорганизмов из флаконов отбиралось по 5 мл аликвоты в стерильные пробирки. Затем по 10 мкл аликвоты высевали на 5% кровяной агар (обогащенный сывороткой и дрожжевым экстрактом), шоколадный агар, среду Сабуро. Засеянные чашки инкубировали в атмосфере, содержащей 5% CO₂ при 37°C в течение 16-24 ч. Для анаэробной субкультуры – чашки с анаэробным 5% кровяным агаром инкубировали при 37°C в анаэрокате. Идентификацию выросших колоний производили 2 методами: фенотипическим (с использованием автоматического бактериологического анализатора Vitek 2 (BioMérieux, Франция), для идентификации грибов – панели API ID 32C (BioMérieux, Франция), окраски по Граму, теста на каталазу, оксидазу) и методом MALDI-TOF MS на анализаторе Vitek MS (BioMérieux, Франция). Нами исключены из исследования полимикробные гемокультуры (4 флакона), а также 1 флакон из-за поздних

сроков доставки. Идентификация микроорганизмов, выделенных из положительных гемокультур, полученных от пациентов различных отделений стационара, с помощью MALDI-TOF MS выполнялась в лаборатории «QualityMed» Екатеринбурга. Транспортировка крови в лабораторию осуществлялась с помощью курьера, время доставки варьировало от 7 ч. до 2 суток. В основе ускоренной методики лежит модифицированный метод интактных клеток с использованием раствора сапонины в качестве лизирующего компонента [18, 19]. На 1-м этапе происходит осаждение крупнодисперсных частиц и лизис форменных элементов, отмывка. После этого осадок бактериальных клеток готов для нанесения на слайд. На 2-м этапе – нанесение бактериальной массы на 2-3 точки слайда, покрытие 1 мкл матрицы (α -циано-3-гидроксикоричная кислота), высушивание, считывание прибором масс-спектров и сравнение с базой данных. Данный метод имеет некоторые преимущества перед методом экстракции: сокращается количество манипуляций и экономится время, осадок бактерий является «жизнеспособным», т.е. он пригоден для дальнейших этапов исследования (определения чувствительности к антибиотикам, ПЦР-диагностики для обнаружения генов антибиотикорезистентности, латекс-агглютинации) [20, 21]. Включение в протокол добавления раствора сапонины для гемолиза эритроцитов повышает чувствительность методики. Было отмечено, что некоторые бактерии, чаще всего грамположительные кокки, имеют «привязанность» к эритроцитам и могут быть удалены вместе с ними в некоторых протоколах исследования (центрифугирование в пробирках с гелем и др.) [22]. Схематично ускоренная идентификация бактерий из положительных гемокультур представлена на Рисунке 1. Если интенсивность пиков была недостаточна для адекватной идентификации микроорганизма, то выполняли повторное нанесение осадка клеток, и экстракция белков проводилась непосредственно на слайде «сэндвич-методом» (добавление 1 мкл ацетонитрила, 1 мкл муравьиной кислоты, 1 мкл матрицы с последовательным высушиванием на воздухе). Латекс-агглютинацию проводили по стандартной методике, используя для антигена *Streptococcus pneumoniae* набор Pastorex Meningitidis (Bio-Rad, Франция), для *Streptococcus pyogenes* – PathoDextra Strep Grouping Kit (Thermo Fisher Scientific, Великобритания).

Результаты

Результаты ускоренной идентификации микроорганизмов из положительных гемокультур представлены в Таблице 1. Методом сравнения выступал метод субкультивирования на твердых питательных средах, при котором чистые культуры микроорганизмов идентифицировались методом MALDI-TOF MS. Всего из 104 флаконов, включенных в исследование, было выделено 70 штаммов грамположительных бактерий, 29 штаммов грамотрицательных бактерий, 4 штамма дрожжеподобных грибов. Еще 1 штамм *S. pneumoniae* не был получен в культуре из-за явления аутолиза.

При применении ускоренной методики корректно идентифицировано 86 штаммов микроорганиз-

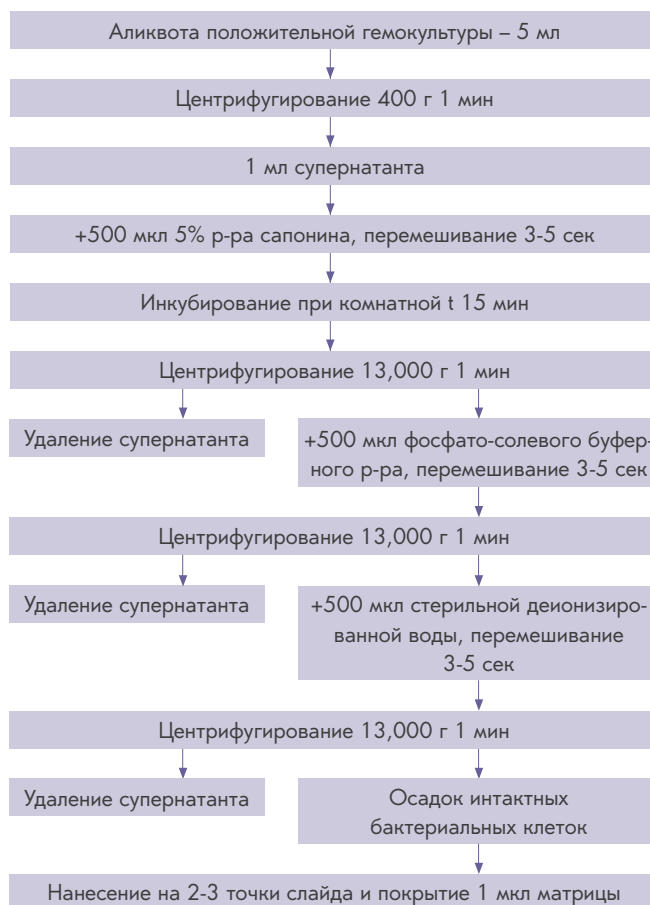


Рисунок 1. Схема ускоренной идентификации микроорганизмов из положительных гемокультур

мов (82,7%), из них 29 штаммов грамотрицательных бактерий. Среди всех грамположительных бактерий, представленных как кокками, так и палочками, не удалось идентифицировать ускоренным методом 14 штаммов бактерий (80,3%). В одном случае культура *S. pneumoniae* лизировалась, а ускоренная идентификация проведена методом латекс-агглютинации. В целом, процент успешной ускоренной идентификации по всем группам бактерий составил 86,0%, при этом для грамотрицательных палочек он достигал 100%, а для грамположительных кокков (традиционно подразумеваются стафилококки, стрептококки, энтерококки) – 83,5%.

Что касается возбудителей фунгемий, то их не удалось идентифицировать ускоренным методом. В нашем исследовании фунгемия в трех случаях была вызвана *Cryptococcus neoformans* и в одном случае – *Lodderomyces elongisporus*.

Мы установили, что в 100% (29/29) совпадение идентификации рутинными методами и методами с применением MALDI-TOF MS касалось бактерий порядка Enterobacterales (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*) и неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ); другие грамотрицательные микроорганизмы в нашем исследовании не были причиной бактериемии. В некоторых случаях наблюдалось расхождение результатов (9% случаев), по-

Таблица 1. Результаты идентификации микроорганизмов при использовании ускоренного метода (n=104)

Группа	Микроорганизм	Всего штаммов, n	Всего успешно идентифицированных ускоренным методом, n
Enterobacterales	<i>Escherichia coli</i>	14	14
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	8
	<i>Enterobacter cloacae/asburiae</i>	2	2
	<i>Proteus mirabilis</i>	3	3
	НГОБ*	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
Staphylococcus spp.	<i>S. aureus</i>	37	30
	<i>S. capitis</i>	2	2
	<i>S. epidermidis</i>	7	5
	<i>S. hominis</i>	6	6
	<i>S. haemolyticus</i>	5	3
Enterococcus spp.	<i>E. faecalis</i>	5	5
Streptococcus spp.	<i>S. pneumoniae</i>	3(+0)**	2(+1)**
	<i>S. pyogenes</i>	1	1
Другие	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	1
	<i>Weissella confusa</i>	1	0
	<i>Bacillus cereus</i> group	1	1
	<i>Clostridium paraputrificum</i>	1	0
Грибы	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	0
	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	1	0

* НГОБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии.

** В одном случае культура лизировалась, ускоренная идентификация методом латекс-агглютинации.

лученных при идентификации фенотипическим методом (на основании биохимических, микроскопических, морфологических свойств) и методом масс-спектрометрии. Как следует из Таблицы 2, это касалось практически исключительно грамположительных микроорганизмов.

Мы полагаем, что в данном случае дискордантные результаты обусловлены отличиями базовых основ применяемых методов: фенотипический подход – в классической методике и протеомный – в масс-спектрометрическом анализе.

Среднее время индикации роста микроорганизмов во флаконах, включая грибы, составило 13,9 ч., для грамотрицательных бактерий – 11,2 ч., для грамположительных – 13,2 ч. Затраты времени на проведение ускоренной методики, включая пробоподготовку и считывание прибором масс-спектров, составляли 1-1,5 ч. в зависимости от количества проб.

Обсуждение

Многие авторы указывают, что независимо от метода ускоренной идентификации, процент успешной идентификации всегда меньше у грамположительных бактерий, особенно в группе коагулазонегативных стафилококков [12, 23-25]. Было высказано предположение, что более прочная клеточная стенка (за счет наличия около 40 слоев мууреина) уменьшает эффективность экстракции белков, а также медленный рост некоторых видов способствует тому, что после извлечения формируемый осадок имеет недостаточный объем. Данное положение справедливо и для грибов. Подсчитано, что метод MALDI-TOF MS требует около 10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ), чтобы иметь достаточное количество бактериальных рибосомальных белков и получить надежную интенсивность пиков, являющихся специфичными для определенного патогена [26].

В этом случае необходимо попытаться провести идентификацию другими доступными методами, например, используя латекс-агглютинацию для выявления антигенов. Прежде всего, забирая аликвоту крови из флакона, можно обратить внимание на ее состояние после инкубирования, это касается, прежде всего, гемолиза. Получая осадок бактериальных клеток из крови, можно заметить, что цвет осадка имеет чаще всего характерный белый цвет у грамотрицательных бактерий (Рисунок 2а), а у грамположительных бактерий семейства Streptococcaceae (по нашим наблюдениям у *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*), а также реже у *Enterococcus faecalis* – зеленовато-коричневый (Рисунок 2б), обусловленный присутствием метгемоглобина. Таким образом,

Таблица 2. Дискордантные результаты при идентификации методами с применением MALDI-TOF MS и фенотипическим методом (n=10)

Ускоренный метод (MALDI-TOF MS)	Субкультивирование + MALDI-TOF MS	Результат идентификации фенотипическим методом
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>Bacillus cereus</i> group	<i>Bacillus cereus</i> group	Грам+ споровые палочки
2 <i>Staphylococcus hominis</i>	2 <i>Staphylococcus hominis</i>	2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>
Нет идентификации	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Нет идентификации	<i>Weissella confusa</i>	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus lentus/xylosis</i>
Нет идентификации	<i>Clostridium paraputrificum</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
Нет идентификации	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	<i>Candida albicans</i>

используя данные визуального наблюдения, можно подобрать латекс-тест для обнаружения стрептококкового антигена. Кроме того, можно повысить процент идентификации *S. aureus*, применяя латекс-тест для стафилококкового антигена.

Так, методами с применением MALDI-TOF MS (как ускоренным, так и путем выделения чистой культуры) был идентифицирован *Leuconostoc mesenteroides*. *Leuconostoc* – род грамположительных бактерий, входящих в семейство Leuconostocaceae, порядок Lactobacillales. В мазке, как правило, представлены кокковыми формами, образующими цепочки, что делает их похожими на стрептококки. Их особенностью является природная устойчивость к ванкомицину, поэтому важна идентификация этого редко встречающегося в клинической практике патогена. Данный микроорганизм рутинным методом был идентифицирован до рода *Streptococcus*. Между тем, показано его клиническое значение при выделении из крови у иммунокомпрометированных пациентов [30] и у детей [31].

Другим примером преимущества идентификации с помощью MALDI-TOF MS служит детекция еще одного микроорганизма, вызывающего бактериемию у определенной категории пациентов, – *Bacillus cereus* [32]. При этом рутинным методом данный микроорганизм не был идентифицирован, а по микроскопическим признакам был отнесен к группе грамположительных спорообразующих палочек.

Еще одним примером расхождения результатов, полученных разными методами, является идентификация дрожжеподобного гриба *Lodderomyces elongisporus*, относящегося к порядку Saccharomycetales, семейству Saccharomycetaceae. В отличие от дрожжеподобных грибов рода *Candida*, образует аски с 1 или 2 аскоспорами, истинный мицелий отсутствует (в отличие от *Candida albicans*), но может формироваться псевдомицелий, сахара сбраживает слабо [33]. На хромогенной среде для дрожжевых грибов (BBL Chromagar Candida, Becton Dickinson) колонии *L. elongisporus* имеют ярко выраженный бирюзовый цвет [34]. По данным литературы, *L. elongisporus* высевается из образцов крови, таким образом, подчеркивается роль этого вида в этиологии фунгемии, чаще всего связанной с катетерами [35, 36].

В остальных случаях расхождение результатов наблюдалось на уровне вида в группе коагулазонегативных стафилококков и *Clostridium spp.*, что не имело клинического значения.

Учитывая значимые различия в чувствительности грамотрицательных бактерий (*P. aeruginosa*, некоторых

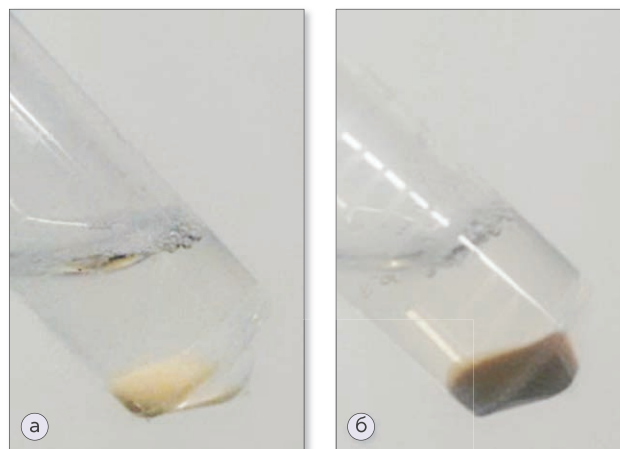


Рисунок 2. Осадок бактериальных клеток *Escherichia coli* после пробоподготовки

Enterobacterales), точная идентификация ускоренным методом важна и может позволить более быструю оптимизацию таргетной терапии, особенно с учетом данных локального микробиологического мониторинга [23].

Ограничения исследования

Ограничением нашего исследования является то, что образцы крови для ускоренной идентификации не были сразу включены в диагностику. Такая задержка могла привести к переоценке возможности метода из-за дополнительного роста микроорганизма и концентрации белков, или, наоборот, могла снизить процент успешной идентификации лабильных микроорганизмов, которые подверглись аутолизу. Данный метод ускоренной диагностики не использовался для обнаружения в крови смешанных культур.

Заключение

Применение методов ускоренной идентификации положительных гемокультур с помощью MALDI-TOF MS позволяет надежно определять возбудителей грамотрицательных бактериемий, однако эффективность ускоренной детекции грамположительных кокков снижается до 83,5%.

Благодарность

Авторы выражают свою признательность директору «QualityMed» Сац А.П. за поддержку проведения исследования.

Литература

- Kumar A., Roberts D., Wood K., et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the clinical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006;34(6):1589-1596.
- Ferrer R., Martin-Loeches I., Phillips G., et al. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline – based performance improvement program. *Crit Care Med.* 2014;42(8):1749-1755.
- Barie P., Hydo I., Shou J., et al. Influence of antibiotic therapy on mortality of critical illness caused or complicated by infection. *Surg Infect.* 2005;6(1):41-54.
- Barochia A., Gui X., Vitberg D., et al. Bundled care for septic shock: an analysis of clinical trials. *Crit Care Med.* 2010;38(2):668-778.
- Galeski D., Mikkelsen M., Bard R., et al. Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal – directed therapy was initiated in emergency department. *Crit Care Med.* 2010;38(4):1045-1053.
- Seng P., Drancourt M., Gouriet F., et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009;49:543-551.
- Stevenson L.G., Drake S.K., Murray P.R. Rapid Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48(2):444-447.
- Fothergill A., Kasinathan V., Hyman J., et al. Rapid Identification of Bacteria and Yeasts from Positive-Blood-Culture Bottles by Using a Lysis-Filtration Method and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrum Analysis with the SARAMIS Database. *J Clin Microbiol.* 2013;51(3):805-809.
- Machen A., Drake T., Wang Y.F. Same Day Identification and Full Panel Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles Made Possible by a Combined Lysis-Filtration Method with MALDI-TOF VITEK Mass Spectrometry and the VITEK2 System. *PLoS One.* 2014;9(2):e87870.
- La Scola B., Raoult D. Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS One.* 2009;4(11):e8041.
- Priputnevich T.V., Melkumyan A.R., Burmenskaya O.V., et al. Use of MALDI-TOF Mass-Spectrometry and Quantitative PCR for Rapid Diagnosis of Sepsis. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2014;16(1):4-9. Russian. (Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р., Бурменская О.В. и соавт. Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2014;16(1):4-9.)
- Neuville F., Descy J., Huynen P., et al. Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction. *J Med Microbiol.* 2012;61:1511-1516.
- Yonetani S., Ohnishi H., Ohkusu K., Matsumoto T., Watanabe T. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *Int J Infect Dis.* 2016;52:37-42.
- Popov D.A., Nadtochey E.A., Vostrikova T.Yu., Ovseenko S.T. Accelerated Techniques of Pathogen Identification from Positive Blood Cultures by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2016;18(4):296-307. Russian. (Попов Д.А., Надточей Е.А., Вострикова Т.Ю., Овseenко С.Т. Ускоренные методы идентификации положительных гемокультур с применением MALDI-TOF масс-спектрометрии. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2016;18(4):296-307.)
- Kok J., Thomas L.C., Olma T., Chen S.C.A., Iredell J.R. Identification of Bacteria in Blood Culture Broths Using Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Sepsityper and Time of Flight Mass Spectrometry. *PLoS One.* 2011;6(8):e23285.
- Popov D.A., Ovseenko S.T., Vostrikova T.Yu. Express identification of positive blood cultures using direct MALDI-TOF mass spectrometry. *Anesteziologija i reanimatologija.* 2015;60(5):71-75. Russian. (Попов Д.А., Овseenко С.Т., Вострикова Т.Ю. Экспресс-идентификация положительных гемокультур с помощью метода прямой MALDI-TOF масс-спектрометрии. *Анестезиология и реаниматология.* 2015;60(5):71-75.)
- Vincent J-L., Moreno R., Takala J., et al. The SOFA (Sepsis-Related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med.* 1996;22(7):707-710.
- Ferreira L., Sánchez-Juanes F., Munoz-Bellido J.L., González-Buitrago J.M. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1007-1012.
- Jakovljevic A., Bergh K. Development of a rapid and simplified protocol for direct bacterial identification from positive blood cultures by using matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *BMC Microbiol.* 2015;15:258.
- Sung J.J., Park K.G., Han K., Park D.J., Park Y.J. Direct Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria From Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and the Vitek 2 System. *Ann Lab Med.* 2016;36:117-123.
- Angeletti S., Dicuonzo G., D'Agostino A., et al. Turnaround time of positive blood cultures after the introduction of matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *New Microbiol.* 2015;38:379-386.
- Schieffer K.M., Tan K.E., Stamper P.D., et al. Multicenter evaluation of the Sepsityper™ extraction kit and MALDI-TOF MS for direct identification of positive blood culture isolates using the BD BACTEC™ FX and VersaTREK diagnostic blood culture systems. *J Appl Microbiol.* 2014;116:934-941.
- Ruiz-Aragón J., Ballester-Téllez M., Gutiérrez-Gutiérrez B., et al. Direct bacterial identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry: A systematic review and meta-analysis. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2018;36(8):484-492.
- Chien J.-Y., Lee T.-F., Du S.-H., et al. Applicability of an in-House Saponin-Based Extraction Method in Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry System for Identification of Bacterial and Fungal Species in Positively Flagged Blood Cultures. *Front Microbiol.* 2016;7:1432.
- Lin J., Ge M., Liu T., Chang S., Lu J. A simple method for rapid microbial identification from positive monomicrobial blood culture bottles through matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Immunol Infect.* 2018;51(5):659-665.
- Morgenthaler N. G., Kostrzewa M. Rapid Identification of Pathogens in Positive Blood Culture of Patients with Sepsis: Review and Meta-Analysis of the Performance of the Sepsityper Kit. *Int J Microbiol.* 2015;827416:10.
- Tholpady S.S., Sifri C.D., Sawyer R.G., et al. *Leuconostoc pseudomesenteroides* blood stream infection following liver transplantation. *Ann Transplant.* 2010;15(1):61-66.
- Florescu D., Hill L., Sudan D., Iwen P. C. *Leuconostoc* Bacteremia in Pediatric Patients With Short Bowel Syndrome: Case Series and Review. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27(11):1013-1019.
- Horii T., Notake S., Tamai K., Yanagisawa H. *Bacillus cereus* from blood cultures: virulence genes, antimicrobial susceptibility and risk factors for blood stream infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011;63:202-209.
- Bab'eva I.P., Chernov I.Ju. Yeasts biology. M.: 2004, p. 175-176. Russian. (Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.: 2004, с. 175-176.)
- Lockhart S.R., Messer S.A., Pfaller M.A., Diekema D.J. *Lodderomyces elongisporus* Masquerading as *Candida parapsilosis* as a Cause of Bloodstream Infections. *J Clin Microbiol.* 2008;46(1):374-376.
- Ahmad S., Khan Z. U., Johny M., et al. Isolation of *Lodderomyces elongisporus* from the Catheter Tip of a Fungemia Patient in the Middle East Publishing Corporation. *Case Rep Med.* 2013;560406:5.
- Hatanaka S., Nakamura I., Fukushima S., Ohkusu K., Matsumoto T. Catheter-Related Bloodstream Infection Due to *Lodderomyces elongisporus*. *J Infect Dis.* 2016;69:520-522.