



Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
 Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
www.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273) Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя
<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции
 214019, г. Смоленск, а/я 5.
 Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
cmac@antibiotic.ru

Электронная версия журнала:
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2022.

Содержание

Болезни и возбудители

- 93 Гомон Ю.М., Колбин А.С., Стрижелецкий В.В., Иванов И.Г., Султанова Ф.М., Балыкина Ю.Е. Систематический обзор и метаанализ данных по безопасности антиинтерлейкиновой терапии COVID-19
- 108 Андреева И.В., Толпыго А.В., Андреев В.А., Азизов И.С., Гольман И.А., Осипова Н.Н., Привольнев В.В., Стецюк О.У., Соколовская В.В. Психобиотики: новое направление в психофармакологии, или как бактерии влияют на наш мозг?
- 134 Рыбалкина Т.Н., Пульнова Н.Л., Каражас Н.В., Бошняк Р.Е., Корниенко М.Н., Черешнева Е.В., Иванова М.Ю., Спиридонова А.С., Кабикова О.Ф., Габриэлян Н.И. Роль пневмоцист в этиологии бронхолегочных осложнений у пациентов с ортотопической трансплантацией сердца
- 139 Попов Д.А., Вострикова Т.Ю., Рогова Т.В., Магандалиева А.С., Керефова М.А. Колонизация слизистых оболочек «проблемной» микрофлорой и этиология послеоперационных инфекционных осложнений у детей первого года жизни с врожденными пороками сердца

Антибиотикорезистентность

- 147 Умпелева Т.В., Шульгина М.В., Вахрушева Д.В., Еремеева Н.И. Чувствительность к антибактериальным препаратам нетуберкулезных микобактерий комплекса *Mycobacterium avium*, выделенных у пациентов Уральского федерального округа
- 156 Ермолаева С.А., Карпова Т.И., Андриянов П.А., Журилов П.А., Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Аксенова Е.И., Кунда М.С., Лискова Е.А., Груздева О.А., Климова Е.А., Посуховский Е.А., Кареткина Г.Н., Мелкумян А.Р., Орлова О.Е., Бурмистрова Е.Н., Пронина Т.В., Тартаковский И.С. Распространение антимикробной устойчивости среди клинических и пищевых изолятов *Listeria monocytogenes*, выделенных в Москве в 2019–2021 гг.

Антимикробные препараты

- 165 Козлов А.В., Лямин А.В., Жестков А.В., Гусякова О.А., Халиулин А.В. Обмен железа в бактериальной клетке: от физиологического значения к новому классу антимикробных препаратов

Лабораторная диагностика

- 171 Мальчикова А.О., Клясова Г.А. *In house* метод ускоренной идентификации грибов из положительной гемокультуры с помощью матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии у больных с инфекцией кровотока

Опыт работы

- 181 Митрохин С.Д., Орлова О.Е., Янковская О.С., Гостева И.В., Галицкий А.А., Карпова И.В., Ведяшкина С.Г., Шкода А.С. Опыт применения антибактериальной терапии у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 на госпитальном этапе лечения (предварительные итоги и рекомендации)

In house метод ускоренной идентификации грибов из положительной гемокультуры с помощью матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии у больных с инфекцией кровотока

Мальчикова А.О., Клясова Г.А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

Контактный адрес:

Анна Олеговна Мальчикова
Эл. почта: anmalchikova@mail.ru

Ключевые слова: фунгемия, кандидемия, положительная гемокультура, ускоренная идентификация, MALDI-TOF масс-спектрометрия.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Представить результаты применения *in house* метода ускоренной идентификации грибов из положительной гемокультуры в сравнении с «классическим» методом, используя матрично-активированную лазерную десорбционную ионизационную времяпролетную (MALDI-TOF) масс-спектрометрию у больных с инфекцией кровотока.

Материалы и методы. Проспективное исследование было проведено с 2016 по 2019 г. в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Кровь для микробиологического исследования брали в коммерческие флаконы с жидкой питательной средой, предназначенной для культивирования микроорганизмов в автоматическом анализаторе для гемокультур BACTEC FX (Becton Dickinson, США). После сигнала прибора о наличии положительной гемокультуры проводили микроскопию препарата с окрашиванием по Граму. При выявлении дрожжевых клеток или мицелия грибов использовали одновременно ускоренный *in house* и «классический» метод идентификации микроорганизмов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии на анализаторе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Для проведения ускоренного метода идентификации кровь из флакона с положительной гемокультурой переносили в пробирку, центрифугировали и проводили экстракцию белков грибов раствором додецилсульфата натрия. «Классический» метод заключался в исследовании положительной гемокультуры на плотных питательных средах Сабуро с хлорамфениколом (bioMérieux, Франция) – для дрожжеподобных грибов и Сабуро с декстрозой (Oxoid, Великобритания) – для мицелиальных грибов.

Результаты. Всего было получено 16 положительных гемокультур, из которых в монокультуре были выделены 14 (87,5%) *Candida* spp.: *C. parapsilosis* (n = 5), *C. tropicalis* (n = 4), *C. albicans* (n = 3), *C. krusei* (n = 1), *C. guilliermondii* (n = 1), один (6,3%) *Rhodotorula mucilaginosa* и один (6,3%) *Fusarium dimerum*. Ускоренным *in house* методом была проведена успешная верификация до рода 75% (12/16) изолятов, до вида – 68,8% (11/16). Результаты идентификации исследуемых грибов до рода и вида ускоренным методом полностью совпали с идентификацией «классическим» способом. Медиана времени от постановки флакона в автоматический анализатор до идентификации грибов ускоренным *in house* методом была статистически значимо короче в сравнении с «классическим» методом и составила 36 ч. 20 мин. против 55 ч. 31 мин. соответственно ($p = 0,028$).

Выводы. Отмечен высокий процент успешных видовых идентификаций и сокращение времени до верификации грибов из положительной гемокультуры с помощью ускоренного *in house* метода. Предложенный способ следует использовать в реальной практике микробиологических лабораторий с целью сокращения времени представления результатов в клинические отделения.

Original Article

In house method for rapid identification of fungi from fungus-positive bottles by MALDI-TOF mass spectrometry in patients with bloodstream infection

Malchikova A.O., Klyasova G.A.

National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russia

Contacts:

Anna O. Malchikova
E-mail: anmalchikova@mail.ru

Key words: fungemia, candidemia, positive blood culture, rapid identification, MALDI-TOF mass spectrometry.

Objective. To present the results of using in-house method for rapid identification of fungi from fungus-positive bottles with routine conventional culture-based identification by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in patients with bloodstream infection.

Materials and methods. Prospective study was performed from 2016 to 2019 at the National Research Center for Hematology, Moscow. During the study period, all blood cultures (BC) bottles obtained from hematological patients were incubated in the BACTEC FX system (Becton Dickinson, USA). Positive BC bottles were examined by Gram stain. *In house* method was used after Gram stain was positive for

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

yeast cells or hyphae. For that, BC media was transfer from fungus-positive bottles into tube. *In house* method included series section steps consisted from centrifugation and extraction of fungal proteins by adding of sodium dodecyl sulfate. Routine conventional culture-based identification on Sabouraud with chloramphenicol agar (bioMerieux, France) for yeasts and on Sabouraud dextrose agar (Oxoid, UK) for molds was used simultaneously with the *in house* method.

Results. During the study period, 16 fungus-positive bottles were obtained from which were isolated in monoculture 14 (87.5%) *Candida* spp.: *C. parapsilosis* (n = 5), *C. tropicalis* (n = 4), *C. albicans* (n = 3), *C. krusei* (n = 1), *C. guilliermondii* (n = 1), one (6.3%) *Rhodotorula mucilaginosa* and one (6.3%) *Fusarium dimerum*. The *in house* method resulted in 75% (12/16) and 68.8% (11/16) identification rate at the genus and species level of fungi, respectively. The identification of fungi to species level was confirmed by conventional culture-based method in all cases. The median time from the start of vial incubation in BACTEC FX system to identification of fungi by *in house* method was less than conventional culture-based identification: 36 hrs 20 min vs 55 hrs 31 min ($p = 0.028$).

Conclusions. A high rate of correct direct species identification and significant reduction in time to verification of fungi from fungus-positive bottles by *in house* method were obtained. The proposed *in house* method should be recommended for use in real microbiology practice to reduce the time for submitting results of identification to clinical units.

Введение

Успехи современной программной химиотерапии опухолей системы крови сопряжены с развитием тяжелых инфекционных осложнений, в число которых входят фунгемии [1, 2]. Чаще всего возбудителями являются *Candida* spp. Тяжелое течение и высокая летальность при этой инфекции по-прежнему остаются актуальной проблемой современной клинической гематологии. Доказано, что при кандидемии задержка этиотропной терапии на каждые 12 ч. увеличивает показатели летальности в 3 раза (с 11,1% до 33,1%, $p < 0,05$) [3]. Спектр возбудителей кандидемий широко варьирует в разных странах и медицинских центрах в зависимости от контингента больных и используемых противогрибковых препаратов. Общей тенденцией последних лет является изменение видового состава выделенных из крови *Candida* spp. за счет сокращения доли *C. albicans* до 15–35%, увеличения и расширения видового разнообразия *Candida non-albicans*, а также детекции новых видов, таких как *C. auris* [4, 5–9].

Доля других дрожжеподобных грибов в спектре возбудителей фунгемий достигает 14,5% [2, 9]. Среди грибов, не относящихся к *Candida* spp., чаще из крови детектируют *Saprochaete* spp., *Saccharomyces* spp., *Rhodotorula* spp., *Cryptococcus* spp., *Malassezia* spp. и другие, большая часть которых отличается природной резистентностью к эхинокандинам [2, 9].

Согласно рекомендациям Европейской организации по исследованию и лечению рака и Группы по изучению микозов (EORTC/MSG), опубликованным в 2020 г., «классический» подход к верификации возбудителя фунгемии заключается в проведении световой микроскопии и культурального исследования положительной гемокультуры на плотных питательных средах [10]. Морфология всех дрожжеподобных грибов при световой микроскопии с окрашиванием мазков крови по Граму идентична и представлена грамположительными овальными клетками, при этом их дифференцировка до родовой принадлежности на этом этапе является сложной [9, 10]. От получения положительной гемокультуры до идентификации грибов, используя «классический»

метод исследования на плотных питательных средах, проходит от 1 (при использовании масс-спектрометрии) до 2 суток. Препараты выбора для лечения кандидемий и фунгемий, вызванных другими дрожжеподобными грибами, отличаются. Так, при кандидемии следует назначать эхинокандины, а при детекции из крови других дрожжеподобных грибов используют азолы или амфотерицин В [5, 11, 12]. Удлинение периода идентификации возбудителей фунгемий ведет к увеличению частоты летальных исходов. В связи с этим ранняя идентификация возбудителя как минимум до рода является крайне важной задачей для реализации прецизионной терапии [9]. В этой работе мы представляем результаты применения *in house* метода для ускоренной идентификации грибов из положительной гемокультуры в сравнении с «классическим» методом, используя матрично-активированную лазерную десорбционную ионизационную времяпролетную (MALDI-TOF) масс-спектрометрию.

Материалы и методы

Клинический материал и особенности его исследования

В период с 2016 по 2019 г. было исследовано 16 положительных гемокультур, полученных от больных, находившихся в клинических отделениях ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России. Кровь для микробиологического исследования брали у больных при температуре от 38°C и выше из периферической вены и/или из центрального венозного катетера. Образцы крови вносили в коммерческие флаконы с жидкой питательной средой, предназначенной для культивирования микроорганизмов (BACTEC Plus Aerobic/F, BACTEC Mycosis-IC/F, Becton Dickinson, США). Флаконы с кровью инкубировали в автоматическом анализаторе для гемокультур BACTEC FX (Becton Dickinson, США). После сигнала прибора о наличии положительной гемокультуры проводили микроскопию препарата крови с окрашиванием по Граму. При выявлении дрожжевых

клеток или мицелия грибов параллельно использовали ускоренный *in house* и «классический» метод идентификации микроорганизмов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии на анализаторе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия).

In house метод ускоренной идентификации грибов из положительной гемокультуры

Применяли *in house* способ ускоренной идентификации грибов, предложенный Клясовой Г.А., Мальчиковой А.О. и Джулакяном У.Л. [13], согласно которому проводили последовательные этапы центрифугирования для лизиса форменных элементов крови. Разрушение клеточной стенки грибов осуществляли добавлением раствора додецилсульфата натрия (SDS). После извлечения продуктов лизиса с помощью деионизированной воды и этилового спирта проводили экстракцию белков грибов, используя муравьиную кислоту и ацетонитрил. Далее осуществляли масс-спектрометрический анализ на анализаторе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Для этого с каждой ячейки в автоматическом режиме получали белковые масс-спектры исследуемых микроорганизмов, при соотношении которых с эталонными спектрами в таксономической базе данных вычислялся коэффициент совпадения (КС), представленный в виде баллов (score). В качестве критерия надежной идентификации дрожжеподобных грибов использовали $КС > 1,9$, если не менее двух первых идентификаций совпадали по виду и/или роду, или $КС > 1,2$, когда не менее четырех первых идентификаций микроорганизмов совпадали по виду и/или роду [14, 15].

«Классический» метод идентификации грибов из положительной гемокультуры

Для идентификации грибов «классическим» способом проводили посев содержимого флакона с положительной гемокультурой на агаризованные среды Сабуро с хлорамфениколом (bioMerieux, Франция) – для дрожжеподобных грибов и Сабуро с декстрозой (Oxoid, Великобритания) – для мицелиальных грибов. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 37°C. Через 18–24 ч. получали культуру грибов, затем изолированные колонии наносили в трех повторностях на ячейки мишени, после чего немедленно добавляли 1 мкл 100% раствора муравьиной кислоты (для экстракции белков) и высушивали. Затем в каждую ячейку вносили по 1 мкл специального реагента – «матрицы» (α -циано-4-гидроксикоричная кислота и раствор, содержащий 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). После высушивания слайда с нанесенными образцами при комнатной температуре выполняли идентификацию грибов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра в автоматическом режиме. В качестве критерия надежной видовой идентификации микроорганизмов использовали рекомендуемые значения КС от 2,0 и выше, родовой верификации – от 1,7 до 1,9. Для калибранта использовали тест-стандарт белкового экстракта *E. coli* (Bruker Daltonics, Германия). Процедуру калибровки выполняли на ячейке слайда, содержащей образец бактериального тест-стандарта.

Статистический анализ

Для анализа результатов исследования была создана база данных. Статистическую обработку результатов проводили в программе IBM SPSS Statistics, версия 21. Различия между характеристиками оценивали с помощью точного критерия Фишера и считали статистически значимыми при степени вероятности безошибочного прогноза 95% ($p < 0,05$). Результаты идентификации грибов ускоренным *in house* методом сравнивали с «классическим» способом.

Результаты

Всего из гемокультуры было выделено 16 изолятов грибов, из них 15 дрожжеподобных и один мицелиальный – *Fusarium dimerum* (Таблица 1). Дрожжеподобные грибы были представлены преимущественно *Candida* spp. ($n = 14$), в одном случае – *Rhodotorula mucilaginosa*. Все микроорганизмы были выделены в монокультуре.

При использовании ускоренного *in house* метода успешная верификация грибов до рода была получена у 75% (12 из 16) изолятов, до вида – у 68,8% (11 из 16). Результаты идентификации исследуемых грибов до рода и вида ускоренным методом полностью совпали с идентификацией «классическим» способом (Таблица 2). Наибольшая доля успешных идентификаций до вида с помощью ускоренного *in house* метода была выявлена у *C. parapsilosis* (80%, 4 из 5 изолятов) и *C. tropicalis* (75%, 3 из 4 изолятов). Среди *C. albicans* только 1 (33%) из 3 изолятов был идентифицирован до вида. В анализ были включены по одному изоляту *C. guilliermondii*, *R. mucilaginosa* и *F. dimerum*, для которых также успешно была установлена видовая принадлежность. С помощью ускоренного метода не удалось провести видовую идентификацию одного изолята *C. krusei*.

Медиана времени инкубации флаконов с гемокультурой до получения положительного сигнала составила 35 ч. 14 мин. (разброс от 5 ч. 38 мин. до 91 ч. 08 мин.) и различалась у разных видов дрожжеподобных грибов: минимальной была для *C. tropicalis* – 15 ч. 31 мин. (разброс от 5 ч. 38 мин. до 18 ч. 34 мин.), мак-

Таблица 1. Спектр грибов, выделенных из флаконов с положительной гемокультурой

Микроорганизмы	n
<i>Candida</i> spp.	14
<i>Candida parapsilosis</i>	5
<i>Candida tropicalis</i>	4
<i>Candida albicans</i>	3
<i>Candida krusei</i>	1
<i>Candida guilliermondii</i>	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1
<i>Fusarium dimerum</i>	1
Всего	16

Таблица 2. Результаты идентификации грибов ускоренным *in house* и «классическим» методами

	Время инкубации в автоматическом анализаторе до положительного сигнала	Ускоренный <i>in house</i> метод идентификации грибов			«Классический» метод идентификации грибов				Разница во времени между методами идентификации	1 – совпадение, 0 – нет	
		Время от начала инкубации флакона до идентификации грибов, ч:мин	Время, затраченное на подготовку и идентификацию грибов, ч:мин	Идентификация грибов до вида и рода	Коэффициент идентификации (Score)	Время от начала инкубации флакона до идентификации грибов, ч:мин	Время, затраченное на получение культуры и идентификацию грибов, ч:мин	Идентификация грибов до вида и рода			Коэффициент идентификации (Score)
1	5:38	6:37	0:59	<i>C. tropicalis</i>	1,8	16:21	10:43	<i>C. tropicalis</i>	2,0	+9:44	1
2	23:05	24:03	0:57	<i>R. mucilaginosa</i>	1,6	40:10	17:04	<i>R. mucilaginosa</i>	2,1	+16:07	1
3	37:35	38:34	0:59	<i>C. parapsilosis</i>	1,7	60:54	23:19	<i>C. parapsilosis</i>	2,3	+22:20	1
4	56:30	57:25	0:55	<i>C. parapsilosis</i>	1,7	76:30	20:00	<i>C. parapsilosis</i>	2,0	+19:05	1
5	37:07	38:05	0:58	<i>C. albicans</i>	1,6	64:05	26:58	<i>C. albicans</i>	2,6	+26:00	1
6	33:38	34:34	0:56	<i>C. parapsilosis</i>	1,6	50:08	16:30	<i>C. parapsilosis</i>	2,4	+15:34	1
7	42:09	43:08	0:59	<i>Candida spp.</i>	1,5	67:39	25:30	<i>C. parapsilosis</i>	2,6	+24:31	1
8	91:08	92:05	0:57	<i>Candida spp.</i>	1,1	112:38	21:30	<i>C. krusei</i>	2,3	+20:33	1
9	48:11	49:09	0:58	<i>C. guilliermondii</i>	1,9	67:11	19:00	<i>C. guilliermondii</i>	2,5	+18:02	1
10	18:34	19:30	0:56	<i>C. tropicalis</i>	1,7	39:04	20:30	<i>C. tropicalis</i>	2,4	+19:34	1
11	26:19	27:16	0:57	<i>C. parapsilosis</i>	1,9	49:46	23:27	<i>C. parapsilosis</i>	2,4	+22:30	1
12	12:27	13:22	0:55	<i>C. tropicalis</i>	1,8	30:22	17:55	<i>C. tropicalis</i>	2,5	+17:00	1
13	35:14	НП	0:58	НИ	НП	56:14	НП	<i>C. albicans</i>	2,7	НП	0
14	50:17	НП	0:56	НИ	НП	68:17	НП	<i>C. albicans</i>	2,6	НП	0
15	24:37	НП	0:57	НИ	НП	39:07	НП	<i>C. tropicalis</i>	2,8	НП	0
16	58:11	59:10	0:59	<i>F. dimerum</i>	1,9	95:30	37:19	<i>F. dimerum</i>	2,3	+36:20	1

НИ – нет идентификации; НП – не применимо.

Таблица 3. Время от начала инкубации флаконов с гемокультурой в автоматическом анализаторе до идентификации грибов ускоренным *in house* и «классическим» методами

Грибы	Идентификация				p
	Ускоренный <i>in house</i> метод		«Классический» метод		
	Медиана (ч:мин)	Разброс (ч:мин)	Медиана (ч:мин)	Разброс (ч:мин)	
Все дрожжеподобные грибы (n = 12)	36:20	6:37–92:05	55:31	16:21–112:38	0,028
<i>Candida</i> spp. (n = 11)	38:05	6:37–92:05	60:54	16:21–112:38	0,039
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (n = 1)	24:03		40:10		НП
<i>Fusarium dimerum</i> (n = 1)	59:10		95:30		НП

НП – не применимо.

симальной – для *C. krusei* (91 ч. 08 мин.). Медиана времени от начала инкубации флаконов с гемокультурой до получения результатов идентификации всех дрожжеподобных грибов (n = 12) ускоренным *in house* методом была статистически значимо меньше и составила 36 ч. 20 мин. (разброс от 6 ч. 37 мин. до 92 ч. 05 мин.) против 55 ч. 31 мин. (разброс от 16 ч. 21 мин. до 112 ч. 38 мин.) при верификации грибов «классическим» методом (p = 0,028) (Таблица 3). Идентификация грибов *Candida* (n = 11) до рода ускоренным *in house* методом составила 38 ч. 05 мин. (разброс 6 ч. 37 мин. до 92 ч. 05 мин.) против 60 ч. 54 мин. (разброс от 16 ч. 21 мин. до 112 ч. 38 мин.) «классическим» методом (p = 0,039). Идентификация *F. dimerum* ускоренным *in house* методом была получена через 59 ч. 10 мин., а «классическим» методом – через 95 ч. 30 мин.

Затраты времени на проведение идентификации микроорганизмов ускоренным *in house* методом, включая пробоподготовку и идентификацию на масс-спектрометре, составляли 55–59 мин., тогда как идентификация с помощью «классического» метода была получена только через 18–48 ч. Медиана разницы во времени между идентификацией дрожжеподобных грибов ускоренным *in house* и «классическим» методами составила 19 ч. 20 мин. (разброс от 9 ч. 44 мин. до 26 ч. 00 мин.), а для *F. dimerum* – 35 ч. 40 мин. (Таблица 3).

Обсуждение

Сокращение времени до получения результатов идентификации микроорганизмов из положительной гемокультуры относится к предикторам выживаемости больных с фунгией по причине более раннего начала прецизионной терапии [3]. Появление MALDI-TOF масс-спектрометрии в клинической практике стало прорывом в ускоренной верификации этиологических агентов при инфекциях. Благодаря этой технологии более ранняя идентификация возбудителя не только до рода, но и до вида, стала реальностью в ежедневной работе бактериологических лабораторий.

«Классическая» идентификация грибов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии предполагает получение культуры микроорганизмов на плотных питательных средах, которое длится до 48 ч. В нашей работе этот показатель варьировал от 16 ч. 21 мин. до 112 ч. 38 мин.

Необходимость ускорения верификации возбудителей фунгией привела к разработке способов идентификации микроорганизмов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии после краткосрочной (3–6 ч.) инкубации положительной гемокультуры на плотных питательных средах (субкультивирование), что позволило значимо сократить время получения результатов по сравнению с «классическим» методом. К ограничениям данного подхода относятся некруглосуточный режим работы лаборатории, поскольку для грибов необходимо более длительное время для роста, а также невысокий процент успешных идентификаций, не превышающий 44% [16]. В качестве альтернативных были предложены методы прямой ускоренной идентификации грибов из положительных гемокультур. Эти подходы основаны на видоспецифичной детекции ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), использовании ПЦР с последующим секвенированием продуктов амплификации или флуоресцентной гибридизации *in situ*. Эти методики являются либо дорогостоящими, либо трудоемкими, и их применение крайне ограничено в реальной лабораторной практике [17, 18].

Дальнейшие исследования, направленные на сокращение времени идентификации грибов, стали возможными после разработки методов по предварительной обработке положительной гемокультуры с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии, минуя этап культивирования и ПЦР. Для реализации такого подхода к идентификации доступны как коммерческие тест-системы, так и внутренние (*in house*) алгоритмы, основанные либо на дифференциальном центрифугировании, либо на использовании реагентов для лизиса клеточной стенки грибов (Таблица 4) [16, 19–23].

В исследовании Jeedi F. и соавт. [21] было проведено сравнение коммерческой тест-системы Sepsityper kit (Bruker Daltonics, Германия) и *in house* методики с использованием SDS для ускоренной идентификации грибов из положительной гемокультуры с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. В анализ было включено 69 флаконов с положительной гемокультурой. Всего в монокультуре было выделено 69 грибов, включая 28 (40,58%) *C. albicans*, 16 (23,18%) *C. glabrata*, 10 (14,49%) *C. parapsilosis*, 3 (4,34%) *C. tropicalis*, 3 (4,34%) *C. dubliniensis*, 2 (2,89%) *C. orthopsilosis*, 2 (2,89%) *C. lusitaniae*, 2 (2,89%) *Rhodotorula mucilaginosa*, 2 (2,89%) *Mucor circinelloides-f-janssenii* и

Таблица 4. Методы ускоренной идентификации грибов

Авторы, год	Грибы, n	MALDI	Объем гемокультуры для исследования, мл	Режим центрифугирования для удаления ферментов крови	Лизис клеточной стенки грибов	Центрифугирование	Отмывка	Центрифугирование	Экстракция белков грибов и нанесение на мишень MALDI масс-спектрометра	Время до идентификации	Успешная идентификация грибов
Rodriguez-Sanchez B. et al., 2013 (19)	51	Microflex LT Biotyper	8	150 g 10 мин.	Осадок гомогенизированной с 1 мл деионизированной воды	14170 g 1 мин.	Ресуспендировать осадок в 300 мкл дистиллированной воды и 900 мкл 100% этанола	14170 g 2 мин.	Осадок высушить, ресуспендировать в 50 мкл 70% муравьиной кислоты и 50 мкл ацетонитрила (центрифугировать), 1 мкл супернатанта нанести на мишень MALDI масс-спектрометра	~ 20 мин.	До рода: 10%; до вида: 6%
Fothergill A. et al., 2013 (20)	17	Vitek MS	2	Нет	1,0 мл лизисного буфера (0,6% полиоксидилена в 0,4M 3-циклогексилмино-1-пропансульфонной кислоты), перемешать 5 сек, инкубировать 2–4 мин. при комнатной температуре	Нет (фильтрация через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм)	20 мМ фосфатный буфер, 0,05% полиоксидилена, 0,45% NaCl, после – деионизированная вода	Нет	Осадок грибов нанести на мишень MALDI масс-спектрометра, высушить, покрыть 1 мкл 28,9% муравьиной кислоты, высушить, добавить 1 мкл α-циано-4-тидроксикоричной кислоты	~ 40 мин.	До вида: 94,1%
Jeddi F. et al., 2017 (21)	94	Microflex LT Biotyper	1,8	13 000 g 2 мин.	Осадок гомогенизировать с 1,8 мл деионизированной воды (центрифугирование), затем 1,8 мл 0,1% SDS, инкубация 10 мин. (центрифугирование), затем 1,8 мл деионизированной воды	13000 g 2 мин.	Ресуспендировать осадок в 300 мкл дистиллированной воды и 900 мкл этанола	13000 g 2 мин.	Осадок высушить, ресуспендировать в 10–20 мкл 70% муравьиной кислоты и 10–20 мкл ацетонитрила (центрифугировать), 1 мкл супернатанта нанести на мишень MALDI масс-спектрометра	~ 20 мин.	До вида: 92,8%
Wu Sh. et al., 2019 (22)	9	Microflex LT Biotyper	8	3 000 g 10 мин.	Ресуспендировать осадок в 1 мл деионизированной воды	12000 g 5 мин.	1 мл деионизированной воды	12000 g 5 мин.	Осадок ресуспендировать в 1 мл деионизированной воды (центрифугировать), нанести на мишень MALDI масс-спектрометра, высушить, покрыть 1 мкл 70% муравьиной кислоты, высушить, добавить 1 мкл α-циано-4-тидроксикоричной кислоты	~ 50 мин.	До рода: 22,2%; до вида: 11,1%
BD Sepsityper (21)	94	Microflex LT Biotyper	1	Нет	200 мкл лизисного буфера	13000 g 2 мин.	1 мл буфера для отмывки (центрифугирование), ресуспендировать осадок в 300 мкл дистиллированной воды и 900 мкл этанола	13000 g 1 мин.	Осадок высушить, ресуспендировать в 10–20 мкл 70% муравьиной кислоты и 10–20 мкл ацетонитрила (центрифугировать), 1 мкл супернатанта нанести на мишень MALDI масс-спектрометра	~ 20 мин.	До вида: 66%

1 (1,44%) *Pichia caribbica*. Идентификация до вида всех грибов была подтверждена секвенированием. При использовании SDS был получен более высокий процент видовых идентификаций микроорганизмов (92,8%) в сравнении с Sepsityper kit (62,3%). Мицелиальные грибы ($n = 2$), включенные в анализ, не были идентифицированы с помощью всех ускоренных методик, описанных в работе. Стоит отметить, что в представленном исследовании ученых из Франции уникальной особенностью предложенного *in house* метода было применение двух стадий лизиса. Первая стадия лизиса с водой была направлена на разрушение и удаление из образцов форменных элементов и белков крови, которые могут генерировать дополнительные пики в масс-спектре, препятствуя правильной верификации микроорганизма методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Добавление 0,1% раствора SDS во второй стадии лизиса привело к нарушению целостности клеточной стенки грибов. В нашей работе для лизиса также были использованы деионизированная вода и 0,1% раствор SDS, процент успешных идентификаций грибов до вида составил 66,7%.

В работе исследователей из госпиталя Тайваньского национального университета также был получен высокий процент (72,4%) успешных идентификаций дрожжеподобных грибов [23]. Всего в исследование с 2014 по 2015 г. было включено 365 монокультур, полученных из флаконов с кровью на автоматическом анализаторе Bactec FX, среди которых было 29 *Candida* spp. Идентификация возбудителей инфекций кровотока была проведена на MALDI-TOF масс-спектрометре с помощью фенотипических методов и ускоренного способа с использованием сапонина для лизиса клеточной стенки грибов. Экспресс-методом было верифицировано до вида 13 (44,8%) грибов, до рода – 21 (72,4%). Наибольшая доля успешных видовых идентификаций была выявлена среди *C. glabrata* (57,1%, 4 из 7), *C. albicans* (50,0%, 5 из 10) и *C. parapsilosis* (50,0%, 2 из 4). В исследование был включен всего 1 штамм *C. krusei*, но и для него удалось установить видовую принадлежность. Низкий процент идентификаций был получен для *C. tropicalis*, всего 1 (14,3%) из 7 изолятов был идентифицирован до вида. Результаты представленного исследования частично согласуются с нашими, где успешная видовая идентификация также чаще была получена у *C. parapsilosis* (80%). В то же время нам удалось верифицировать до вида 3 из 4 штаммов *C. tropicalis*. Более высокий процент успешных идентификаций в нашем исследовании можно объяснить использованием пробирок с гелем, предназначенных для дополнительного отделения клеточных элементов и белков от сыворотки крови. В 2016 г. было опубликовано исследование, проведенное в ФГБУ «НМИЦ сосудисто-сердечной хирургии им. А.Н. Бакулева» Минздрава России. В анализ были включены 201 образец гемокультуры, из которых параллельно проводили фенотипический и ускоренный методы идентификации с использованием сапонина на MALDI-TOF масс-спектрометре (bioMérieux, Франция) [16]. Спектр возбудителей инфекций кровотока был представлен грамположи-

тельными ($n = 109$), грамтрицательными бактериями ($n = 82$), а также дрожжеподобными грибами ($n = 10$). Успешная идентификация грибов была получена всего в 40% (4 из 10) случаев. До рода были идентифицированы 2 (66,6%) из 3 *C. parapsilosis*, 2 (33,3%) из 6 *C. albicans*. Не удалось установить родовую принадлежность для 1 изолята *C. glabrata*. Невысокий процент идентификаций грибов экспресс-методом в этом исследовании мог быть обусловлен использованием флаконов BacT/ALERT FA (bioMérieux, Франция) с гранулами активированного угля, которые бывает тяжело отделить от биомассы микроорганизмов.

Недостатком ускоренных методик является невозможность идентификации грибов в тех случаях, когда гемокультура представлена сочетанием микроорганизмов. Так, в проведенное во Франции исследование [21] было включено 2 гемокультуры с ассоциацией из двух микроорганизмов, первая из которых была представлена *C. albicans* и *Pseudomonas aeruginosa*, а вторая – *C. albicans* и *Enterococcus faecalis*. При использовании ускоренного способа верификации возбудителей исследования удалось идентифицировать из крови лишь бактерии, а грибы были выявлены в результате проведения микроскопии положительной гемокультуры с окрашиванием по Граму и «классического» культурального метода. Необходимо отметить, что ускоренная методика верификации микроорганизмов не исключает проведение световой микроскопии положительной гемокультуры и «классического» культурального способа для подтверждения полученного результата. Микроскопию положительной гемокультуры необходимо применять перед использованием методов ускоренной и «классической» идентификации микроорганизмов для исключения ошибок в верификации возбудителей инфекций кровотока.

Рекомендованные КС (score) для идентификации грибов до рода методом MALDI-TOF масс-спектрометрии составляют от 1,7 до 2,0, до вида – более 2,0. Эти значения адаптированы для идентификации микроорганизмов, полученных на плотных питательных средах. В случае применения ускоренных методов, исключающих «классический», разные авторы предлагают считать валидными результаты верификации микроорганизма при КС от 1,9 и более в том случае, если не менее двух первых идентификаций совпадают по виду и/или роду, а также и более низкие КС от 1,2 и более, если не менее четырех первых идентификаций микроорганизмов идентичны по виду и/или роду [14–15]. В нашем исследовании было подтверждено, что снижение порогового значения КС не влияет на частоту правильных идентификаций при условии совпадения видовой или родовой идентификации по первым четырем позициям. Для каждого гриба, полученного из положительной гемокультуры ускоренным методом, было определено от 5 до 7 первых идентичных по виду позиций с КС от 1,2 и более. В дальнейшем при использовании «классического» метода было получено совпадение идентификации микроорганизмов. При КС от 1,2 и более было полное сходство родовой принадлежности у 12 из 12 изолятов, а при КС от 1,6 и более – полное соответствие видовой

принадлежности у 11 из 11 изолятов. У одного изолята с КС 1,1 была подтверждена родовая принадлежность при сравнении с культурой микроорганизма.

Таким образом, проведенное исследование показало высокий процент (69%) успешных видовых идентификаций грибов из крови с помощью ускоренного *in house* метода, а также, что крайне важно, сокращение времени до верификации грибов из положительной гемокультуры до 36 ч. 20 мин. против 55 ч. 31 мин. «классическим» методом, что является основополагающим для назначения своевременной адекватной терапии, направленной на предупреждение развития тяжелых жизнеугрожающих состояний, таких как септический шок и полиорганная недостаточность. Предложенный метод

идентификации грибов из положительной гемокультуры с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии следует использовать в реальной практике микробиологических лабораторий с целью сокращения времени представления результатов в клинические отделения.

Работа выполнена в рамках Государственного задания АААА-А18-118012490209-7 «Изучение молекулярных детерминант устойчивости к антимикробным препаратам и генетического разнообразия у бактерий и грибов в гематологии». Федеральная служба по интеллектуальной собственности номинировала данный патент в категорию «100 лучших изобретений России за второе полугодие 2020 года».

Литература

1. Klyasova G.A., Speranskaya L.L., Mironova A.V., Maschan M.A., Baidildina D.D., Vereshchagina S.A., et al. The pathogens causing sepsis in immunocompromised patients: structure and problems of antibiotic resistance (results of a multicenter study). *Gematologija i transfuziologija*. 2007;52(1):11-18. Russian. (Клясова Г.А., Сперанская Л.Л., Миронова А.В., Масчан М.А., Байдильдина Д.Д., Верещагина С.А. и соавт. Возбудители сепсиса у иммунокомпрометированных больных: структура и проблемы антибиотикорезистентности (результаты многоцентрового исследования). *Гематология и трансфузиология*. 2007;52(1):11-18.)
2. Salmanton-García J., Koehler P., Kindo A., Falces-Romero I., García-Rodríguez J., Ráčil Z., et al. Needles in a haystack: Extremely rare invasive fungal infections reported in FungiScope® – Global Registry for Emerging Fungal Infections. *J Infect*. 2020;81(5):802-815. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.08.015
3. Morrell M., Fraser V.J., Kollef M.H. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(9):3640-3645. DOI:10.1128/AAC.49.9.3640-3645.2005
4. Klyasova G., Malchikova A., Molchanova I., Kutsevalova O., Maschan M., Vetokhina A., et al. Epidemiology of Invasive Candidiasis in Hematological (Hem) and Non-Hematological (Non-Hem) Patients: Results of Prospective Multicenter Study in Russia. Proceedings of the 10th Trends in Medical Mycology, October 8-11, 2021, Aberdeen, Scotland, Organized by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM). *J Fungi*. 2021;7(11):916. P. 177. DOI: 10.3390/jof7110916
5. Kalinina I.I., Baydildina D.D., Suntsova E.V., Goronkova O.V., Khachatryan L.A., Petrova U.N., et al. Results of candidemia treatment in children with hematologic malignancies: single center experience. *Oncohematology*. 2011;3:24-35. Russian. (Калинина И.И., Байдильдина Д.Д., Сунцова Е.В., Горонкова О.В., Хачатрян Л.А., Петрова У.Н. и соавт. Результаты тера-
- пии кандидемии у детей с различными гематологическими и онкологическими заболеваниями в условиях одного центра. *Онкогематология*. 2011;3:24-35.) DOI: 10.17650/1818-8346-2011-6-3-24-34
6. Vasilyeva N.V., Kruglov A.N., Pchelin I.M., Riabinin I., Raush, E., Chilina G., et al. The first Russian case of candidaemia due to *Candida auris*. Proceedings of the 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Madrid, Spain, April 21-24, 2018. P0311.
7. Klyasova G., Malchikova A., Maschan M., Molchanova I., Kutsevalova O., Chernenkaya T., et al. *In vitro* activity of echinocandins and azoles against *Candida* spp. Isolated from hematological (HEM) and non hematological (non-hem) patients in 11 centers of Russia. 8th Trends in Medical Mycology, 6-9 October 2017, Belgrade, Serbia. *Mycoses*. 2017;60(S2):65. P. 022. DOI: 10.1111/myc.12674
8. Malchikova A., Klyasova G. *In vitro* activity of anidulafungin, caspofungin, fluconazole and amphotericin B against biofilms and planktonic forms of *Candida* species isolated from blood culture in patients with hematological malignancies. *J Med Mycol*. 2021;31(3):101162. DOI: 10.1016/j.mycmed.2021.101162
9. Klyasova G.A., Blokhina E.V., Okhmat V.A., Malchikova A.O., Parovichnikova E.N. Successful treatment of disseminated invasive mycosis caused by *Saprochaete capitata* in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Gematologija i transfuziologija*. 2017;62(3):164-168. Russian. (Клясова Г.А., Блохина Е.В., Охмат В.А., Мальчикова А.О., Паровичникова Е.Н. Успешное лечение диссеминированного инвазивного микоза, вызванного *Saprochaete capitata*, у больного острым лимфобластным лейкозом. *Гематология и трансфузиология*. 2017;62(3):164-168.) DOI: 10.18821/0234-5730-2017-62-3-164-168
10. Donnelly J.P., Chen S.C., Kauffman C.A., Stevens D.A., Edwards J.E., Calandra T., et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and

- Research Consortium. Clin Infect Dis. 2020;71(6):1367-1376. DOI: 10.1093/cid/ciz1008
11. Klyasova G.A., Malchikova A.O., Tandilova K.S., Blohina E.V., Parovichnikova E.N., Kravchenko S.K., Savchenko V.G. Treatment of candidemia caused by *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in patients with hematological malignancies. Terapevticheskij arhiv. 2019;91(8):84-92. Russian. (Клясова Г.А., Мальчикова А.О., Тандилова К.С., Блохина Е.В., Паровичникова Е.Н., Кравченко С.К., Савченко В.Г. Лечение кандидемий, вызванных *Candida albicans* и *Candida non-albicans*, у больных с опухолями системы крови. Терапевтический архив. 2019;91(8):84-92.) DOI: 10.26442/00403660.2019.08.000385
 12. Veselov A.V. The current place of echinocandins in the treatment and prophylaxis of invasive fungal infections. Klinicheskaa mikrobiologija i antimikrobnaa himioterapija. 2020;22(3):197-209. Russian. (Веселов А.В. Эхинокандины в терапии и профилактике инвазивных микозов. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020;22(3):197-209.) DOI: 10.36488/стас.2020.3.197-209
 13. Klyasova G.A., Malchikova A.O., Dzhulakyan U.L. Method for identifying *Candida* spp. and other yeast-like fungi from positive blood culture by matrix laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in patients with blood flow infection RF. Patent No. 2 739 758, Byull Izobret., No. 1 (2020). Russian. (Патент № 2739758 Российская Федерация, МПК G01N 33/48 (2006.01). Способ идентификации *Candida* spp. и других дрожжеподобных грибов из положительной гемокультуры методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) у больных с инфекцией кровотока: № 2020109645; заявлено 05.03.2020; опубликовано 28.12.2020 / Клясова Г.А., Мальчикова А.О., Джулакян У.Л. Патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 14 с.)
 14. 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0008041
 15. Spanu T., Posteraro B., Fiori B., D'Inzeo T., Campoli S., Ruggeri A., 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):176-179. DOI: 10.1128/JCM.05742-11
 16. Popov D.A., Nadtochey E.A., Vostrikova T.Yu., Ovseenko S.T. Accelerated signs of positive blood culture detection using MALDI-TOF mass spectrometry. Klinicheskaa mikrobiologija i antimikrobnaa himioterapija. 2016;18(4):296-307. (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.)
 17. Gorton R.L., Ramnarain P., Barker K., Stone N., Rattenbury S., McHugh T.D., et al. Comparative analysis of Gram's stain, PNA-FISH and Sepsityper with MALDI-TOF MS for the identification of yeast direct from positive blood cultures. Mycoses. 2014;57:592-601. DOI: 10.1111/myc.12205
 18. Martinez R.M., Bauerle E.R., Fang F.C., Butler-Wu S.M. Evaluation of three rapid diagnostic methods for direct identification of microorganisms in positive blood cultures. J Clin Microbiol. 2014;52(7):2521-2529. DOI: 10.1128/JCM.00529-14
 19. Rodríguez-Sánchez B., Sánchez-Carrillo C., Ruiz A., Marín M., Cercenado E., Rodríguez-Crèixems M., Bouza E. Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Microbiol Infect. 2014;20(7):421-427. DOI: 10.1111/1469-0691.12455
 20. Fothergill A., Kasinathan V., Hyman J., Walsh J., Drake T., Wang Y.F. 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. DOI:10.1128/JCM.02326-12
 21. Jeddi F., Yapou-Kouadio G.C., Normand A.C., Casagne C., Marty P., Piarroux R. Performance assessment of two lysis methods for direct identification of yeasts from clinical blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry. Med Mycol. 2017;55(2):185-192. DOI: 10.1093/mmy/myw038
 22. Wu S., Xu J., Qiu C., Xu L., Chen Q., Wang X. Direct antimicrobial susceptibility tests of bacteria and yeasts from positive blood cultures by using serum separator gel tubes and MALDI-TOF MS. J Microbiol Methods. 2019;157:16-20. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.12.011
 23. Chien J.Y., Lee T.F., Du S.H., Teng S.H., Liao C.H., Sheng W.H., Hsueh P.R. 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. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01432