

УДК57.083.18:577.214.3:543.51

ПЦР С ЭЛЕКТРОСПРЕЙ-ИОНИЗАЦИОННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ В ОБНАРУЖЕНИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ГЕМОКУЛЬТУРАХ

¹Васильева Н.В. (директор института),
¹Полищук А.Г. (зав. лаб.)*, ¹Руднева М.В.
(м.н.с.), ¹Дакс А.А. (н.с.), ¹Шурпицкая О.А.
(зав. лаб.), ²Зайцева М.М. (студент)

¹НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова; ²Санкт-Петербургский государственный политехнический университет (отделение медицинской физики и биоинженерии), Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2013

Цель данного исследования – оценка эффективности PLEX-ID платформы, основанной на технологии полимеразной цепной реакции (PCR) с электроспрей-ионизационной время-пролетной (ESI-TOF) масс-спектрометрией (МС), для обнаружения, идентификации и выявления видового разнообразия патогенных микроорганизмов в образцах крови пациентов с подозрением на инфекцию кровотока. 168 гемокультур, полученные в течение трех месяцев, были исследованы с использованием PLEX-ID. Из них 74 были зарегистрированы в аппарате BacT/Alert 3D (bioMérieux) как положительные и 94 – как отрицательные. При сравнении полученных результатов с результатами классической микробиологической идентификации выявили их совпадение в 90,8% и 76% случаев на уровне рода и вида соответственно. Более одного вида микроорганизма было обнаружено в 10 из 74 (13,5%) образцов с помощью PLEX-ID и в 4-х образцах (4%) – с помощью культурального метода. Время идентификации бактерий с использованием PLEX-ID платформы уменьшилось, как минимум, на 24 часа, а грибов рода *Candida* – на 48 ч.

Ключевые слова: гемокультура, пациенты с сепсисом, PLEX-ID, ПЦР с электроспрей-ионизационной время-пролетной масс-спектрометрией

PCR-ELECTROSPRAY IONIZATION MASS-SPECTROMETRY FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF PATHOGENIC MICROORGANISMS FROM BLOOD CULTURE

¹Vasilyeva N.V. (director of the institute), ¹Polischouk A.G. (head of the laboratory), ¹Rudneva M.V. (junior scientific collaborator), ¹Daks A.A. (scientific collaborator), ¹Shurpickaya O.A. (head of the laboratory), ²Zajceva M.V. (student)

¹Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; ²St. Petersburg State Polytechnical University (Department of medical physics and bioengineering), St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2013

The aim of this study was to evaluate the performance of the PLEX-ID platform based on PCR amplification coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (PCR/ESI-TOF MS) for detection, identification, and determination of the distribution of pathogenic microorganisms in blood specimens obtained from patients with suspected bloodstream infections. A total of 154 whole blood cultures (74 positive and 80 negative determined by the BacT/Alert 3D instrument, bioMérieux) collected during 3 month period were evaluated using PLEX-ID and the results were compared with those obtained by microbiology culture. PLEX-ID and microbiology culture reached an agreement of 90,8% at the genus and 76% at the species levels in bacterial and candidal identification. Multiple organisms were detected in 10 out of 74 (13.5%) specimens by PLEX-ID, and in 4 (4%) by culture. Time required for bacteria and *Candida* species identification decreased at least for 24 h and for 48 h, respectively, when using PLEX-ID platform.

Key words: blood culture, PCR/ESI-TOF MS, PLEX-ID, septic patients

* Контактное лицо: Полищук Анна Генриховна,
Тел.: (812) 303-51-40

ВВЕДЕНИЕ

Необходимость внедрения новых технологий быстрой и точной диагностики инфекций кровотока человека – это веление времени. Идеальная технология диагностики должна обеспечивать быстрое начало направленной этиотропной терапии, для чего необходимо быстро и точно определить микроорганизм-возбудитель инфекции и оценить его устойчивость к антимикробным препаратам. В случае сепсиса у пациентов скорость диагностики – ключевой фактор, поскольку каждый час задержки эффективного лечения существенно снижает выживаемость больных [1].

Ныне культуральная диагностика является стандартом для обнаружения микроорганизмов в крови, однако существует ряд ограничений в ее применении. Видовая идентификация возбудителя бактериальной инфекции кровотока и определение его чувствительности к антибактериальным препаратам с помощью традиционных культуральных методов занимает до 3-5 суток. Для возбудителей микозов тот же анализ занимает 5-10 суток. Кроме того, культуральная диагностика не достаточно чувствительна. Результаты посева крови отрицательны более чем в 50% случаев, когда имеются клинические или/и лабораторные данные в пользу генерализованной инфекции [2]. Чувствительность культурального метода существенно снижается в случае, когда образцы крови забирают у пациента на фоне антимикробной терапии. И, наконец, с помощью классических бактериологических методов невозможно обнаружить многие потенциально опасные микроорганизмы (например, *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Tropheryma whipplei*) [3].

ПЦР с электроспрей-ионизационной время-пролетной (PCR-ESI-TOF) масс-спектрометрией (МС) – это новейшая молекулярная технология. Как следует из названия, она сочетает две молекулярные технологии – полимеразную цепную реакцию и электроспрей-ионизационную время-пролетную масс-спектрометрию. PCR-ESI-TOF МС технология обеспечивает возможность скрининга всех присутствующих в образце патогенных микроорганизмов (бактерий, вирусов, грибов и простейших) как предполагаемых, так и неизвестных без предварительного посева. Основной отличительной чертой PCR-ESI-TOF МС системы, с точки зрения технологического преимущества, является ее супермультиплексность, которая обеспечивается на стадии проведения ПЦР. Она достигается использованием праймеров к фрагментам генома, общим для представителей разных царств микроорганизмов, в сочетании с праймерами, специфичными для отдельных групп микроорганизмов, родоспецифичных праймеров и праймеров к участкам генома бактерий, определяющим их устойчивость к антибиотикам (обеспечивая тем самым возможность определения резистентности бактерий к данным антибиотикам). После амплификации со-

ответствующих геномных фрагментов на электроспрей-ионизационном масс-спектрометре производится автоматизированный масс-спектрометрический анализ продуктов амплификации, в ходе которого устанавливаются молекулярные массы ПЦР ампликона и/или смеси ампликонов. Затем с помощью специального программного обеспечения прибор вычисляет нуклеотидный состав ампликона (количественное соотношение каждого нуклеотида). На основании сравнения полученных композиций нуклеотидов с имеющимися в базе данных прибора нуклеотидными композициями, специфичными для известных видов микроорганизмов, анализируемые композиции нуклеотидов автоматически преобразуются в видовые названия микроорганизмов [4].

До 2011 года технологии PCR-ESI-TOF МС, в основном, применяли для расследования вспышек инфекционных заболеваний (например, при вспышках респираторных инфекций среди новобранцев американских вооруженных сил, находившихся в военных условиях) и генотипирования отдельных видов патогенных микроорганизмов [5, 6]. Совсем недавно опубликованы работы по характеристике генома микробов при различных локализациях у пациентов, включая пациентов лечебных стационаров [7-10].

В данном исследовании (впервые в России) использовали диагностическую платформу PLEX-ID (Abbott Molecular, США), основанную на PCR-ESI-TOF МС технологии. PLEX-ID была сертифицирована для клинического применения в Европейском Союзе (CE-mark) в апреле 2012 г.

Цель данного исследования – сравнение результатов PLEX-ID анализа и культуральных методов по точности и скорости идентификации бактерий и грибов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

МАТЕРИАЛЫ

В работе использовали венозную кровь от:

- 1) пациентов стационаров с клиническими признаками инвазивных микозов;
- 2) пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) с клиническими признаками системной воспалительной реакции или с наличием клинических признаков тяжелой пневмонии, перитонита, эндокардита;
- 3) гематологических больных и реципиентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТТСК) с нейтропенией или иммуносупрессией, или клиническими признаками системной воспалительной реакции.

МЕТОДЫ

Забор клинического материала и получение культур.

Взятие материала осуществляли согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

5 мл крови помещали во флаконы с питательной

средой BacT-Alert (BioMérieux, Франция). Флаконы, в которых не обнаруживали рост микроорганизмов в течение 7 суток, считали отрицательными.

Классические методы идентификации микроорганизмов.

Из положительных флаконов незамедлительно проводили высеv на плотные питательные среды, и выделенные культуры микроорганизмов дифференцировали по совокупности свойств с помощью классических методов.

Чувствительность бактерий к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом (диски Becton Dickinson, США) и на аппарате WalkAway-40 (Siemens).

Изучение микробиоты биообразцов с помощью ПЦР-ESI-TOF MS.

Экстракция ДНК микроорганизмов из гемокультур.

ДНК выделяли из 1100 мкл гемокультуры по протоколу производителя. Лизис клеточного содержимого образцов проводили при помощи механического разрушения на гомогенизаторе Precellys (Bertin Technologies, Франция) с использованием лизирующего буфера, содержащего магнитные частицы, от производителя (Abbott Molecular). Выделение и очистку ДНК производили на экстракторе Plex-ID SP (Abbott Molecular) по технологии магнитной сепарации.

Аmplификация ДНК

В исследовании применяли планшеты PLEX-ID платформы VAC Spectrum BC (Рис. 1), VAC Detection и Broad Fungal планшеты.

С помощью планшетов VAC Spectrum BC и VAC Detection, имеющих 96-луночный формат, можно обнаруживать 3000 видов бактерий, 40 видов грибов

рода *Candida*, маркеры резистентности бактерий к антибиотикам: *Staphylococcus* spp. – к метициллину (*mecA*), *Enterococcus* spp. – к ванкомицину A и B (*vanA/B*) и грамм-негативных бактерий – к карбапенемам (*kpc*). В каждой планшете можно производить анализ одновременно 6 клинических образцов, причем каждый образец наносят в 16 лунок, содержащих разные пары праймеров. Каждая лунка планшеты содержит ПЦР смесь (от производителя), состоящую из праймеров (универсальные бактериальные, специфичные для отдельных групп бактерий и для грибов рода *Candida*), ДНК-полимеразу, нуклеотиды, внутренний контроль (ДНК тыквы). Внутренний контроль помогает детектировать контаминацию ПЦР и обеспечивает возможность полуколичественного анализа ДНК в образцах. Универсальные праймеры связываются с консервативными областями генома всех видов патогенных бактерий. Нуклеотидные последовательности, фланкируемые универсальными праймерами, варьируют в зависимости от вида бактерии, что дает возможность осуществлять видовую идентификацию. Наличие дополнительных пар групп и родоспецифичных праймеров повышает точность идентификации. Очищенная ДНК каждого образца была перенесена в 16 лунок планшеты с помощью роботизированного пипеттора для раскапывания планшет (Plex-ID Fluid Handler, Abbott/Tecan). На основе планшеты Broad Fungal идентифицируют различные виды грибов, т.к. она содержит универсальные и родоспецифичные праймеры к фрагментам генома грибов и устроена аналогично, описанной выше. Амплификацию ДНК проводили на термоциклере Plex-ID TC (Eppendorf, Германия) по программам циклирования от производителя.

Масс-спектрометрический анализ.

Клинические образцы (6 образцов /планшета)

	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	
16S rDNA	A	346	346	346	346	346	879	879	879	879	879	879	<i>mecA</i>
	B	348	348	348	348	348	3767/4675	3767/4675	3767/4675	3767/4675	3767/4675	3767/4675	<i>vanA</i> KPC ESBL
Broad Bacterial	C	361	361	361	361	361	3768	3768	3768	3768	3768	3768	<i>vanB</i>
	D	349	349	349	349	349	3030	3030	3030	3030	3030	3030	Candida identification & speciation
Firmicutes	E	3350	3350	3350	3350	3350	3031	3031	3031	3031	3031	3031	
	Staphylococcus Enterobacteriaceae	F	2249/358	2249/358	2249/358	2249/358	2249/358	3766	3766	3766	3766	3766	
G		3346	3346	3346	3346	3346	3865	3865	3865	3865	3865	3865	
Beta/Gammaproteobacteria	H	3921	3921	3921	3921	3921	4437	4437	4437	4437	4437	4437	Pumpkin DNA Extraction Control

Рис. 1. VAC spectrum BC планшета. Каждый образец наносят в 16 ячеек. Четыре ячейки содержат универсальные бактериальные праймеры (к участкам 16S и 23S рибосомальной ДНК бактерий), 4 ячейки - праймеры для отдельных групп и родов бактерий, 3 ячейки - праймеры к участкам генома бактерий, определяющим устойчивость к антибиотикам, 4 - праймеры к участкам ДНК грибов рода *Candida*, 1 - к участкам ДНК тыквы (для контроля эффективности экстракции ДНК). Цифры в кружочках – названия пар праймеров (так, например, для 16S рДНК используют 3 пары праймеров, - 346, 348, 361, для амплификации трех различных участков)

После стадии амплификации, закрытые герметично планшеты переносили в ESI-TOF масс-спектрометр для дальнейшего масс-спектрометрического анализа амплифицированных последовательностей. На первом этапе в масс-спектрометре проводили обессоливание ПЦР-продуктов, затем – анализ очищенной ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика полученного материала. Материал был получен от 156 пациентов (209 образцов крови, 4 – диализата из брюшной полости, 1 – гноя из раны, 1 – ликвора) в течение мая – ноября 2012 года из отделений интенсивной терапии и реанимации СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 15-ти клиник Санкт-Петербурга и 1 клиники Москвы (табл. 1).

Таблица 1.

Медицинские учреждения, из которых поступил клинический материал

Клиника	Кол-во пациентов
Санкт-Петербург	
СЗГМУ им. И.И. Мечникова	64
Институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой	20
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова	19
Городская клиническая больница №31	7
Городская Мариинская больница	6
Городская психиатрическая больница № 3 им. И. И. Скворцова-Степанова	6
Ленинградская Областная Клиническая больница	3
Городская Покровская больница	2
Городская больница Святой преподобномученицы Елизаветы	2
Микологическая клиника НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина	2
Детская городская больница №1	2
Российский нейрохирургический НИИ им. проф. А.Л. Поленова	1
Городская многопрофильная больница №2	1
Городская туберкулезная больница №2	1
Другие	5
Москва	
НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского	15
Всего	156

Из учреждений Санкт-Петербурга большинство образцов были получены от пациентов с онкологическими заболеваниями (27%), гнойно-некротическими процессами в костях и суставах (26%) и острой почечной недостаточностью на фоне сахарного диабета 1 типа (17%) (Рис. 2).

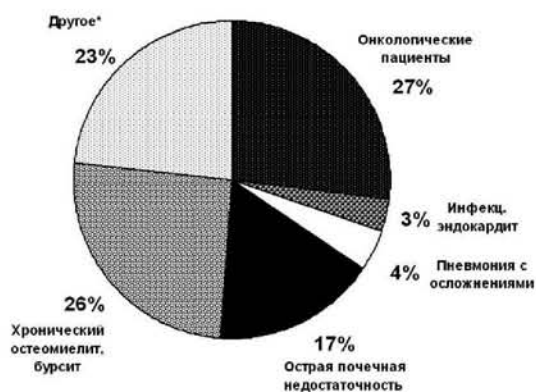


Рис. 2. Клинические диагнозы пациентов, включенных в исследование

* - пациенты с неустановленным диагнозом или с несколькими диагнозами

Сравнительная характеристика ПЦР-ESI-TOF МС и культуральных методов идентификации микроорганизмов.

С помощью PLEX-ID системы было проанализировано 154 образца крови, из которых 74 были положительными и 80 – отрицательными в системе гемокультивирования BacT-Alert. Все положительные в системе BacT-Alert образцы были также положительны при посеве.

Для 138 образцов крови результаты PCR-ESI-TOF МС были сравнены с результатами определения вида при помощи посева на питательные среды. Для положительных образцов крови результаты идентификации микроорганизмов PCR-ESI-TOF МС и культуральным методом не совпали по виду обнаруженных микроорганизмов в 24% случаев, а по роду – в 9,2% (табл.2).

Таблица 2.

Случаи несовпадений идентификации микроорганизмов при использовании технологии PCR-ESI-TOF МС и культурального метода

№	Образец	ПЦР- ESI-TOF МС	Посев
1	кровь	<i>Corynebacterium coyleae</i>	Рост есть (затруднения с идентификацией м/о)
2	кровь	<i>Candida glabrata</i>	Роста нет
3	кровь	<i>C. parapsilosis</i>	Роста нет
4	кровь	<i>Staphylococcus capitis</i> , <i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. epidermis</i>
5	кровь	<i>S. haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
6	кровь	<i>S. haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
7	кровь	<i>S. hominis</i> , <i>Aerococcus viridans</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
8	кровь	<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
9	кровь	<i>Micrococcus lylae</i> , <i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus spp.</i>
10	кровь	<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus spp.</i>
11	кровь	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>A. qenospecies</i>
12	гной	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus spp.</i>
13	диализат из брюшной полости	<i>Trichosporon inkin</i>	Рост есть (затруднения с идентификацией м/о)
14	кровь	<i>S. hominis</i> , <i>Aerococcus viridans</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
15	кровь	<i>S. aureus mecA</i> положительный (MRSA), <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>
16	кровь	Коагулазонегативный <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>S. epidermis</i> , <i>Enterococcus spp.</i>
17	кровь	<i>Propionibacterium acnes</i>	Анаэробные кокки
18	кровь	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. famata</i>

Причины несовпадения были следующие: идентификация при посеве ограничивалась родовой принадлежностью микроорганизма (№ 5-10, 12, 14, 16), микроорганизм не вырос при посеве (№ 2,3), микроорганизм вырос при посеве, но его идентификация была затруднена (№ 1, 13), несовпадение в определении вида при использовании технологии PCR-ESI-TOF МС и культурального метода (№ 4, 11, 15, 18).

Подтвердить видовую идентификацию бактерий, полученной с помощью PCR-ESI-TOF МС, можно используя две молекулярные технологии – ДНК секвенирование и MALDI-TOF масс спектрометрию. В настоящем исследовании результаты идентификации

микроорганизмов в образцах №15 и № 18 с помощью MALDI-TOF MC и PLEX-ID анализов совпали. Отметим, что другими авторами показано также соответствие результатов идентификации бактерий/грибов с использованием PCR-ESI-TOF MC и MALDI-TOF MC технологий [11].

Для того чтобы понять, какова вероятность появления положительных результатов при PLEX-ID анализе в случае, если гемокультура отрицательна в системе гемокультивирования BacT-Alert, мы проанализировали 80 BacT-Alert отрицательных гемокультур. Оказалось, что все отрицательные в BacT-Alert системе образцы были также отрицательны при анализе с помощью PLEX-ID системы, что позволяет предположить одинаковую аналитическую чувствительность обеих систем и рекомендовать BacT-Alert систему для обнаружения микроорганизмов в гемокультурах в рутинной практике. Данные образцы также были отрицательны и при исследовании культуральным методом. Таким образом, результаты всех трех методов детекции микроорганизмов из отрицательных в BacT-Alert системе гемокультур совпали.

Выявление смешанных инфекций.

В настоящем исследовании более чем один микроорганизм был выявлен в десяти из 74 образцов (13,5%) при использовании PLEX-ID системы и в трех образцах из 74 – при посеве (4%) (табл. 3).

Таблица 3.

Идентификация смеси микроорганизмов в образцах крови с использованием технологии PCR- ESI-TOF MC

№ образца	ПЦР- ESI-TOF MC	Посев
1	<i>S. capitis, S. saccharolyticus</i>	<i>S. epidermis</i>
2	<i>M. lylae, M. luteus</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
3,4	<i>S. epidermidis, S. lugdunensis</i>	<i>S. epidermidis</i>
5	<i>S. hominis, A. viridans</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>
6	<i>M. luteus, C. xerosis</i>	<i>M. luteus</i>
7	<i>Pseudomonas putida, S. haemolyticus</i>	<i>P. putida</i>
8	<i>S. epidermidis, S. hominis, C. parapsilosis</i>	<i>S. epidermidis, S. hominis</i>
9	<i>S. aureus mecA</i> положительный (MRSA), <i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus, Burkholderia cepacia</i>
10	Коагулазонегативный <i>Staphylococcus, E. faecalis</i>	<i>S. epidermis, Enterococcus sp.</i>

При использовании PLEX-ID в одном из этих трех образцов была обнаружена дополнительно *Candida parapsilosis*, в другом – *E. faecalis*, в двух оставшихся обоими методами были выявлены 2 микроорганизма, но принадлежавшие к разным видам. Таким образом, PLEX-ID анализ более эффективен, чем культуральный метод, для выявления смешанных культур в крови. Этот результат согласуется с результатами исследований других лабораторий, применявших PCR-ESI-TOF MC для обнаружения микроорганизмов в гемокультурах [4, 9, 12]. С учетом того, что успешное выявление микроорганизмов при использовании метода культивирования напрямую зависит от состава питательной среды, нельзя исключить вероятность

того, что более низкая эффективность культурального метода по выявлению смеси микроорганизмов связана с субоптимальными условиями культивирования. С другой стороны, большая эффективность выявления микроорганизмов может быть связана с более высокой вероятностью ложно-положительного результата при PLEX-ID анализе. Для получения определенного заключения по этому вопросу необходимо подтверждение полученных в PLEX-ID данных результатами еще одной технологии, когда напрямую, без этапа культивирования, удастся идентифицировать все находящиеся в биообразце микроорганизмы. При этом также проводят PCR-ESI-TOF MC, но работают с набором всех ДНК, находящихся в образце. В настоящее время секвенирование «нового поколения» широко используют для анализа генома микробных сообществ окружающей среды и самого человека.

Скорость идентификации.

При использовании PCR-ESI-TOF MC время видовой идентификации бактерий в гемокультурах сократилось, как минимум, на 12-24 часа, а грибов рода *Candida*, как минимум, на 24-48 часов.

Выявление резистентных к антибиотикам бактерий.

Выявление резистентности к антибиотикам в PLEX-ID анализаторе происходило одновременно с видовой идентификацией. С помощью использованной в исследовании аналитической панели существовала возможность выявить устойчивые к метициллину золотистые стафилококки – Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), к ванкомицину А и В – энтерококки, к карбапенемам – грамотрицательные бактерии. При использовании PLEX-ID (как и культурального метода) были обнаружены 2 штамма MRSA. Резистентность бактерий была подтверждена диско-диффузионным методом. Других резистентных к антибиотикам изолятов бактерий не было выявлено.

Корректность определения чувствительности бактерий к антибиотикам с помощью PCR-ESI-TOF MC, согласно работам двух авторских коллективов, колеблется от 69% до 100% для MRSA [7, 13]. Другими авторами показано полное отсутствие соответствия между результатами определения чувствительности золотистого стафилококка к метициллину и энтерококков к ванкомицину А и В при использовании PCR-ESI-TOF MC и традиционных методов определения чувствительности микроорганизмов [10]. В данном исследовании маркер резистентности к метициллину (*mecA*) детектировали в группе коагулазонегативных стафилококков, а маркеры резистентности к ванкомицину А и В (*van A/B*) – у лактобацилл. Подобная ситуация описана и в статье [14].

Спектр выявленных патогенных микроорганизмов.

Всего в положительных образцах гемокультур было выявлено 25 видов микроорганизмов, принадлежавших к шести группам патогенных бактерий (ко-

Таблица 4.

Спектр патогенных микроорганизмов, выявленных в гемокультурах больных с подозрением на сепсис при использовании PCR-ESI-TOF MC

Группы пациентов	Название микроорганизма	Процентное содержание				
		Данное исследование (2013)	Ecker (2010)	Kaleta (2011)	Jordana-Lluch (2013)	
Группа 1	Коагулазонегативный <i>Staphylococcus</i>	39,3	30,5	7,8	14,1	
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	9,5	2,2	3,7	2	
Группа 2	<i>E. faecalis</i>	4,8	4	5,3	8,9	
	<i>Escherichia coli</i>	4,8	10,2	3,7	20,5	
	<i>K.pneumoniae</i>	4,8	5,5	2,9	-	
	<i>Micrococcus</i> spp.	4,8	0,8	2,9	-	
	<i>Candida</i> sp.	4,8	2,3	2,9	-	
	<i>S.aureus</i>	3,6	13,3	15,6	14,1	
	<i>C. albicans</i>	3,6	1,8	1,6	1,2	
	<i>Corynebacterium</i> spp.	3,6	1	1,2	-	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,4	3	2,5	5	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2,4	0,9	2	-	
	Общий %	49,1	45	44,3	51,7	
	Группа 3	<i>E faecium</i>	1,2	4,1	6,1	6,4
		<i>Bacillus</i> spp.	1,2	0,9	1,2	1,3
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,2	0,9	1,2	-
<i>Acinetobacter lwoffii</i>		1,2	0,2	0,4	-	
<i>T. inkin</i>		1,2	-	-	-	
<i>A. viridans</i>		1,2	-	-	-	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		1,2	0,1	-	-	
<i>Pseudomonas putida</i>		1,2	0,2	-	-	
<i>Rhodococcus</i> spp.		1,2	-	-	-	
<i>Burkholderia cepacia/ cenocepacia</i>		1,2	-	-	-	
<i>Propionibacterium acnes</i>		1,2	-	-	-	
<i>Leuconostoc</i> spp.		1,2	-	-	-	
Общий %		14,4	6,4	8,9	7,7	
Всего полож. гемокультур		74	138	244	78	

агулазонегативные стафилококки, грамположительные каталазоотрицательные кокки, представители семейства *Enterobacteriaceae*, неспорообразующие анаэробные бактерии, неферментирующие грамотрицательные бактерии, кислотоустойчивые актинобактерии) и грибы 2 родов – *Candida* и *Trichosporon*.

Для сравнения наших данных о встречаемости микроорганизмов с результатами других авторов, также использовавших метод PCR-ESI-TOF MC для выявления микроорганизмов в гемокультурах, приводим таблицу 4. В исследования Ecker (2010), Kaleta (2011) и Jordana-Lluch (2013) включены положительные образцы крови от пациентов с разнообразными диагнозами из клиник разного профиля, что соответствует дизайну нашего исследования.

Все выявленные нами микроорганизмы можно разделить по встречаемости на 3 условные группы. Большую группу (39,3%) в нашей выборке составили коагулазонегативные стафилококки (КНС), в исследованиях других авторов доля этих микроорганизмов варьирует от 8 до 30%. Как показано ранее, КНС часто являются контаминантами гемокультур [ссылки в 15, 16]. Группа 2 составляет во всех исследованиях примерно равную долю в 45-50%. Однако встречаемость некоторых видов внутри группы значительно различается в сравниваемых исследованиях. Так, например, доля *Staphylococcus aureus* в нашем исследовании 3,6%, тогда как в других исследованиях – 13-15%. Показано, что такие представители группы 2, как *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, в большинстве случаев являются истинными возбудителями бактериемий [17, 18]. Третью группу в нашем исследовании и в исследованиях других авторов составили виды с низкой встречаемостью. Среди этой группы отдельные виды (*Bacillus* spp., *Propionibacterium acnes*) редко вызывают бактериемию и не считаются клинически значимыми [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с целью данного исследования проведен сравнительный анализ результатов обнаружения/идентификации бактерий и *Candida* spp. культуральным методом и с использованием платформы PLEX-ID.

В результате исследования показано, что с помощью PLEX-ID можно существенно сократить время идентификации бактерий и *Candida* spp. в образцах крови, что будет способствовать своевременному назначению этиотропной терапии у пациентов с признаками сепсиса.

В исследовании установлено, что PLEX-ID платформа значительно эффективнее культурального метода в выявлении смешанных инфекций.

Это важное свойство PCR-ESI-TOF технологии позволит врачам эффективно выявлять смешанные инфекции, а в совокупности с клинической картиной и лабораторными исследованиями определять клиническую значимость выявленных патогенов и на-

значать адекватную антимикробную терапию.

Что касается возможности применения PLEX-ID платформы для одновременного определения резистентности некоторых групп бактерий к антибиотикам, то необходимы дальнейшие исследования по данной проблеме.

Результатами нашего исследования подтверждена эффективность PCR-ESI-TOF MC в изучении разнообразия микроорганизмов в биообразцах. Таким образом, PCR-ESI-TOF MC-технология представляется перспективной с точки зрения ее использования для быстрого анализа микробиоты различных биообразцов в рутинной практике.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим сотрудников СЗГМУ им. И.И. Мечникова: ассистента кафедры медицинской микробиологии Пинегину О.Н. и ординатора кафедры медицинской микробиологии Степанова А.С. за помощь в коллекционировании и транспортировке образцов крови; сотрудников отделения лабораторной диагностики микологической клиники НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина – лаборантов Киселеву А.А. и Цветкову Г.В. и врача-бактериолога Ремневу Н.П. за проведение идентификации бактерий и грибов культуральными методами; заведу-

ющего кафедрой клинической микологии, аллергологии и иммунологии, профессора Клишко Н.Н., профессора кафедры медицинской микробиологии Сидоренко С.В., профессора кафедры медицинской микробиологии Бойцова А.Г. и аспиранта кафедры медицинской микробиологии Рябинина И.А. за консультативную помощь; а также всех врачей клинических отделений больниц за предоставление образцов крови для данного исследования.

Также благодарим наших московских коллег из НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Годкова М.А. – заведующего отделом лабораторной диа-

гностики, Черненко Т.В. – заведующую лабораторией клинической микробиологии и Баженова А.И. – заведующего лабораторией клинической иммунологии и диагностики СПИД за предоставление клинического материала и проведение идентификации бактерий культуральными методами.

Работа была выполнена в рамках государственного задания на 2012-2014 гг.

«Изучение эпидемиологии, микробиологический мониторинг внутрибольничных грибковых инфекций, актуальных госпитальных штаммов возбудителей внутрибольничных инфекций».

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Kumar A., Roberts D., Wood K., et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock // *Critical Care Medicine* – 2006. – Vol. 34, № 6. – P. 1589-1596.
2. Dellinger R., Levy M., Carlet J., et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock // *Crit. Care Med.* – 2008. – Vol. 36. – P.296-327.
3. Fenollar E, Raoult D. *Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria*// *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2007. – Vol. 30, *Suppl. 1.* – S7-S15.
4. Ecker D.J., Sampath R., et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections // *Expert Rev. Mol. Diagn.* – 2010. –№10(4). – P. 399-415.
5. Ecker D., Sampath R., Blyn L., et al. Rapid identification and strain-typing of respiratory pathogens for epidemic surveillance // *Proceeding of the NAS of the USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 8012-8017.
6. Wolk D., Kaleta E., Wysocki V. PCR-electrospray ionization mass spectrometry. The potential to change infectious disease diagnostics in clinical and public health laboratories // *The J. of Molecular Diagnostics.* – 2012. – Vol. 14, №4. – P. 295-304.
7. Brinkman C., Vergidis P., Uhl J. PCR-electrospray ionization mass spectrometry for direct detection of pathogens and antimicrobial resistance from heart valves in patients with infective endocarditis // *J. of Clin. Microbiol.* – 2013. – Vol. 51, №7. – P. 2040-2046.
8. Shin J., Ranken J., Sefers S. Detection, identification, and distribution of fungi in bronchoalveolar lavage specimens by use of multilocus PCR coupled with electrospray ionization/mass spectrometry // *J. of Clin. Microbiol.* – 2013. – Vol. 51, №1. – P. 136-141.
9. Laffler T., Cummins L., McClain C., et al. Enhanced diagnostic yields of bacteremia and candidemia in blood specimens by PCR/electrospray ionization mass spectrometry // *J. of Clin. Microbiol., JCM Accepts*, published online ahead of print on 21 August 2013.
10. Yun H., Kreft R., Castillo M. Comparison of PCR/electron spray ionization-time-of-flight-mass spectrometry versus traditional clinical microbiology for active surveillance of organisms contaminating high-use surfaces in a burn intensive care unit, an orthopedic ward and healthcare workers // *BMC Infectious Diseases.* – 2012. – Vol. 12.
11. Kaleta E., Clark A., Cherkaoui A. Comparative analysis of PCR-electrospray ionization/mass spectrometry (MS) and MALDI-TOF/MS for the identification of bacteria and yeast from positive blood culture bottles // *Clin. Chem.* – 2011. – Vol. 57, №7. – P. 1057-1067.
12. Kaleta E.J., Clark A. E., Johnson D.R., et al. Use of PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid identification of bacterial and yeast bloodstream pathogens from blood culture bottles // *J. of Clin. Microbiol.* – 2011. – Vol. 49, №1. – P. 345-353.
13. Jordana-Lluch E., Carolan H., Giménez M., et al. Rapid diagnosis of bloodstream infections with PCR followed by mass spectrometry // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 4, published online on 23 April 2013.
14. Shaw A., Vento T., Mende K., et al. Detection of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* colonization of healthy military personnel by traditional culture, PCR, and mass spectrometry // *Scand J. Infect. Dis.*, published online ahead of print on 19 August 2013 published online ahead of print on 21 August 2013.
15. Hall K., Lyman J. Updated review of blood culture contamination // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2006. – Vol. 19, №4. – P. 788-802.
16. Tsalik E., Jones D., et al. Multiplex PCR to diagnose bloodstream infections in patients admitted from the emergency department with sepsis // *J. of Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48, №1. – P. 26-33.
17. Weinstein M. Blood culture contamination: persisting problems and partial progress // *J. of Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, №6. – P. 2275-2278.
18. Baldwin C. D., Howe G. B., Sampath R., et al. Usefulness of multilocus polymerase chain reaction followed by electrospray ionization mass spectrometry to identify a diverse panel of bacterial isolates // *Diagnostic Microbiol. and Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 63. – P. 403-408.

Поступила в редакцию журнала 10.09.2013

Рецензент: А.А. Кафтырева

