****

**Новый метод культивирования образцов биологических жидкостей человека**

Фонтана С. 1-2, Фаваро М. 1, Минелли С. 2, Босса М.С. 2, Альтьери А. 2, Фавалли С. 1-2 1

1. Кафедра экспериментальной медицины и биомедицинских наук "Tor Vergata", Римский университет, Рим, Италия
2. Клиническая микробиологическая лаборатория, Поликлиника "Tor Vergata", Рим, Италия

**Резюме:** Методы культивирования проб с большим объемом материала стерильных жидкостей организма, при которых используются автоматизированные системы культивирования крови, повышают степень выявления микроорганизмов по сравнению с традиционными методами на чашках Петри. Однако во многих случаях лаборатория получает только пробы с небольшим объемом материала.

Система HB &L Uroquattro (ранее Uro-Quick), первоначально используемая для бактериологического скрининга мочи, оценивалась на предмет обогащения среды и определения количества микробов в образцах биологических жидкостей. 546 образцов биологических жидкостей человека были также оценены на их остаточную антимикробную активность (ОАА). Процедуры сравнивались с результатами обычной процедуры культивирования.

По сравнению с традиционным методом культивирования на чашках Петри, анализатор HB&L (далее HB&L) показал значения чувствительности, специфичности, положительной прогностической ценности (VPP) и отрицательной прогностической ценности (VPN) на 100%, а также полное соотвествие в количественном определении микроорганизмов. Кроме того, система HB&L позволила выявить 44 образца (8% от общего числа) ложноотрицательных результатов на чашках Петри. Тест на ОАА показал хорошее совпадение с классическим референсным методом, со специфичностью и коэффициентом положительной прогностической ценности в 100% каждый, тогда как чувствительность и отрицательная прогностическая ценность составляли 67% и 76% соответственно. Система HB&L представляет собой отличную альтернативу классической методике культивирования и в том числе и при определении КОЕ/мл.

**Справочная информация:** Многие инвазивные и опасные для жизни инфекции, такие как менингит, перикардит, перитонит, септический артрит, эмпиема и пневмония, диагностируются путем культивирования образцов биологической жидкости. Традиционный метод культивирования биологических жидкостей включает культивирование на твердой среде с предварительным обогащением или без него в среде, такой как тиогликолевая среда или сердечно-мозговом бульоне (BHI). Использование бульонной среды в дополнение к нескольким твердым средам уже давно признано полезным методом повышения эффективности восстановления и сокращения времени, необходимого для обнаружения прихотливых микроорганизмов в жидкостях человеческого организма. Другой способ улучшить выявление микроорганизмов заключается в увеличении концентрации образца, что обычно достигается путем центрифугирования. Микроскопия образца также полезна, потому что позволяет быстро обнаружить бактерии. С другой стороны чувствительность микроскопического исследования около 10\*4–10\*5 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл или выше, что может зависеть от техники и опыта оператора и характеристик самого образца.

Несколько исследований подтвердили преимущество использования сред для культивирования крови для улучшения выявляемости клинически значимых изолятов из образцов биологических жидкостей. Последняя процедура требует большого объема образца, что не всегда доступно. Кроме того, при работе с материалом из нижних дыхательных путей (LRS) рекомендуется проводить постоянную оценку материала путем микрокопирования, также как и определения количества микроорганизмов, чтобы минимизировать работу с образцами низкого качества и избежать потенциально вводящей в заблуждение информации.

В частности, оценка количества микроорганизмов с использованием традиционных методов культивирования является трудоемкой, когда нет автоматической системы культивирования крови.

С целью улучшения выявления патогенных микроорганизмов и для предоставления полезной дополнительной информации, такой как подсчет количества патогенных микроорганизмов и исследование остаточной антимикробной активности (ОАА) в образцах биологических жидкостей человека, мы изучили возможность регулярного использования HB&L, Alifax, Падуя, Италия в рутинной практике. Система оценивалась в сравнении с обычными методами культивирования. Мы также представляем результаты тестов ОАА, хотя они обычно не проводятся на образцах стерильных жидкостей человека, учитывая, что это может предоставить полезную дополнительную информацию в микробиологической оценке таких образцов.

**Цель исследования**: изучить возможность использования методики культивирования образцов биологических жидкостей человека в анализаторе HB&L Uro-Quattro в рутинном процессе для увеличения выявляемости патогенных микроорганизмов, измеряемых в КОЕ/мл.

**Материалы и методы:**

**Образцы**: в период с июня 2005 года по январь 2006 года было исследовано 546 образцов биологических жидкостей, в том числе: 106 образцов эндотрахеального аспирата, 63 образца бронхоальвеолярного лаважа, 139 образцов мокроты, 47 образцов крови, 105 образцов плевральной жидкости, 26 образцов спинно-мозговой жидкости, 41 образец перитонеальной жидкости, а также 19 образцов других жидкостей, включая синовиальную жидкость (n = 5), асцитическую жидкость (n = 9), жидкости из дренажа инфицированного центрального венозного катетера (n = 3), брюшная жидкость из дренажа брюшной полости (n = 1) и жидкость из желчного пузыря (n = 1). См. таблицу 1.

**Сбор и обработка образцов**: все биологические жидкости, доставленные для культивирования в микробиологическую лабораторию поликлиники Tor Vergata с июня 2005 года по январь 2006 года, были включены в исследование. Сбор материала от пациента проводился в щадящих пациента условиях, но в исследование включались только собранные надлежащим образом и доставленные в лабораторию в течение 2 часов после сбора образцы. Кроме того, для включения в исследование требовался минимальный объем образца 2 мл, представляющий минимальный объем материала, необходимый для проведения как традиционного посева, так и скрининга на HB&L. Сбор образцов соответствовал стандартным процедурам и руководствам Американского торакального общества для респираторных образцов. Типы образцов, включенных в исследование, представляли собой плевральную, перитонеальную, синовиальную и спинномозговую жидкости (CSF), образцы крови (из флаконов с положительной кровью, субкультивирование которой не показало роста) и образцы из нижних дыхательных путей (LRS), взятые при бронхоальвеолярном лаваже, эндотрахеальные аспираты и мокрота. Были включены только образцы из нижних дыхательных путец, имеющие 5 при микроскопии по схеме Мюррея-Вашингтона. Образцы материала из нижних дыхательных путей (в частности, мокрота), которые были слишком вязкими, чтобы вносить их во флаконы HB&L разжижали с помощью Sputasol (Oxoid, Basingstoke, UK). Окончательный объем после добавления Sputasol был учтен для правильного микробного подсчета.

**Условия культивирования:** Когда образцы поступали в лабораторию, 1 мл пробы жидкости отбирался для скрининга на HB&L, а оставшийся объем был культивирован обычными методами. Образцы центрифугировали при 1180 оборотов/мин в течение 30 минут при комнатной температуре и осадок инокулировали на подходящие твердые среды: шоколадный агар с добавлением CO2, 5% агар с овечьей кровью с инкубацией в аэробных или анаэробных условиях (в последнем для улучшения выявления некоторых стрептококков), MacConkey агар и Сабуро агар. Микробный подсчет выполнялся у каждого образца перед центрифугированием с использованием стандартной методики. Образцы, инокулированные на твердые среды, инкубировали при 37°С в течение 24 часов. Если рост не был очевиден, инкубацию продолжали в течение пяти дней. Образцы с ростом анализировали с использованием системы VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Франция) для идентификации микроорганизма.

**Традиционный метод:** 1 мл образца центрифугировали и осадок высевали в различные культуральные среды, такие как шоколадный агар с добавлением CO2, 5% агар с овечьей кровью, агар MacConkey и агар Сабуро, и инкубировали при 37°C в течение 24 часов в аэробных и анаэробных. Для образцов, отрицательных через 24 часа, инкубацию продлили до 5 дней. Положительные образцы были идентифицированы с помощью системы Vitek2.

**В системе HB&L:** согласно протоколу Alifax, 500 мкл каждого образца инокулировали во флакон для бактериальной культуры и во флакон для исследования на ОАА, в оба флакона вносили добавку DEB для культивирования прихотливых микроорганизмов. Время инкубации было установлено от 235 минут для уровня 1000 КОЕ/мл (6 часов для чувствительности 1 КОЕ/мл). Для контроля системы были протестированы некоторые штаммы ATCC, таких как *Nesseria* и *Haemophilus influenzae*.

**Культуры крови:** 47 образцов крови, включенные в исследование, были только теми, для которых субкультивирование из положительного флакона Bactec 9240F (Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems, Sparks, MD, США) на обычную среду дало отрицательные результаты после 24 ч инкубации при 37°C. Для всех положительных гемокультур из флаконов было выполнено окрашивание по Граму, чтобы подтвердить присутствие бактерий. Только флаконы, в которых рост был очевиден при культивировании, и которые были подтверждены окрашиванием по Граму, считались положительными. Флаконы, из которых не было видно бактерий при микроскопическом исследовании, считались ложноположительными и были исключены из дальнейшего исследования. Две аликвоты по 500 мкл каждой из бульона из положительных флаконов инокулировали соответственно в культуральный флакон HB&L из набора на ОAA Alifax.

**Обработка образцов:** Система HB&L основана на методе рассеяния света, который надежно обнаруживает рост микробов в жидких образцах, обеспечивая кривые роста в реальном времени и подсчет количества бактерий (КОЕ/мл). Кроме того, с помощью теста на ОAA оценка ОАА в жидких образцах осуществляется одновременно со скринингом. Система изначально была разработана для быстрого скрининга образцов мочи. Однако основа метода (нефелометрическое обнаружение включений в рассеянном свете) потенциально делает систему более широко применяемой. Чувствительность системы, выраженная в КОЕ/мл, зависит от времени обнаружения, поэтому для обнаружения 100,000 КОЕ/мл потребуется время 180 мин. Точно так же инкубация должна быть продлена до 235 мин или более (до 6 ч), если порог обнаружения ниже 1000 КОЕ/мл (6 ч <50 КОЕ / мл). Во время скрининга система HB&L также может оценивать ОAA образца (что, как правило, связано с остаточной активностью лекарственного средства, вводимого пациенту до сбора образцов). Результат ОAA является ценной информацией, которая в некоторых случаях может объяснить ложноотрицательный результат посева. Положительный результат ОAA может также побудить микробиолога попробовать другие методы культивирования, чтобы уменьшить отрицательный эффект лекарственного средства, а также считать положительными те БАЛ, которые имеют низкое общее микробное число, ниже, чем общепризнанный предел.

В системе используются два флакона: флакон с желтой крышкой, используемый для культивирования, и флакон с сиреневой крышкой для теста ОAA. Обогащенная среда, содержащаяся в обоих флаконах, предназначена для роста большинства микроорганизмов. Учитывая необходимость культивирования прихотливых микроорганизмов, таких как *Neisseriae* и *Haemophilus*, в СМЖ, в среду было добавлено 200 мкл коммерческой добавки DEB (Alifax), содержащей никотинамидадениндинуклеотид, фактор X и гемин. По прибытии в лабораторию аликвоты по 500 мкл каждого жидкого образца были инокулированы в культуральный флакон и флакон с ОAA. В каждый флакон также внесли добавку, и флакон с ОAA был инокулирован эталонным штаммом *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, в соответствии с инструкциями производителя. Образцы культивировали в HB&L в течение 235 минут до достижения порогового значения 1000 КОЕ/мл. Этого времени достаточно, чтобы получить подсчет общего микробного числа и результат теста на ОAA, и аликвоты бульона из флаконов с культурой были посеяны традиционную твердую среду, ранее использовавшуюся в лаборатории. Результаты традиционного посева сравнивали с результатами, полученными с использованием HB&L. Для некоторых образцов объем материала был недостаточным для проведения и традиционного посева, и двойного культивирования на скрининг и ОАА в HB&L. Для таких образцов тест на ОАА не делали. Поскольку в публикациях с указанием референсных методов не было информации по проведению теста на ОAA в биологических образцах, кроме как для мочи, в качестве эталона мы взяли записи лечащих врачей о назначениях лекарств во время сбора образцов у пациентов.

Для оценки возможностей HB&L для роста прихотливых бактерий, таких как *Neisseria spp.* и *Haemophilus spp*, использовали стандартные эталонные штаммы: *Neisseria lactamica* (ATCC 23970), *N. sicca* (ATCC 9913) и *Haemophilus in fluenzae* (ATCC 49247). Система HB&L поддерживает рост разнообразных бактерий по отдельности или в комбинации, включая те, которые являются клинически значимыми: *Acinetobacter baumannii, Acinetobacter haemolyticus, Aeromonas hydrophila, Bacillus pumilis, Branhamella catharralis, Burkholderia cepacia, Burkholderia gladioli, Candylaglacoly, Campy, albacol., Campy, albacol., Candy. Кандида famata, Candida glabrata, Citrobacter brakii, Citrobacter freundii, Citrobacter koseri, Citrobacter youngae, Clostridium tyrobutiricum, Corynebacterium jeikeium, Corynebacterium propinquum, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus avium, Enterococcus columbae, Enterococcus faecalis, Enterobacter intermedius, Escherichia coli; Gemella morbillorum, Geotricum capitatum, Hafnia alvei, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Micrococcus luteus, Moraxella lacunata, Oligella urealyticum, Pasteurella multocida, Proteus mirabilis, Providencia rettgeri, Providencia stuartii, Pseudomonas aeruginosa, Rhodotorula glutinis, Serratia marcescens, Sphingomonas paucimobilis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis* и, в частности тех, кто растет небольшими колониями, *Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus intermedius, Staphylococcus lentus, Staphylococcus warneri* и коагулазо-негативные стафилококки, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus agalactiae, Streptococcus oralis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes*, и *Streptococcus anginosus*.

Программное обеспечение системы HB&L позволяет загрузить образцы с указанием материала (например, гемокультура, плевральная жидкость, бронхоальвеолярный лаваж и мокрота), а также документировать кривые роста и измерения оптической плотности флаконов с культурой и флаконов с ОAA.

**Статистический анализ:** Был рассчитан стандартный диапазон описательной статистики (среднее и стандартное отклонение). Сравнение пропорций проводилось с помощью двустороннего точного критерия Фишера. Отличия считались значительными при значении p < 0,05.

**Результаты**:

**HB&L против традиционного культивирования:** Клинически значимые бактерии были выделены из 323 из 546 образцов (59%) обоими методами. Кроме того, рост был обнаружен только анализатором HB&L еще в дополнительных 44 образцах (8%), в общей сложности 367 положительных образцов. Ни одной бактерии, не выявленной системой HB&L, не было обнаружено при классическом посеве. Среди 44 образцов, в которых значимый рост был обнаружен исключительно и с помощью системы HB&L (p = 0,007, таблица 1), 29 (67%) были положительными гемокультурами из флаконов системы Bactec 9240, но их субкультивирование на традиционные твердые питательные среды не показало роста. Остальные из 29 образцов, включая мокроту, перитонеальную жидкость и СМЖ (каждый по 2, что составляет 4,6%), плевральную жидкость (n = 6, что составляет 14%) и другие жидкости (n = 3, что составляет 7%). Из последних названных, два были собраны из дренажа около места входа центрального венозного катетера, и один был синовиальной жидкостью. Бактерии, культивируемые исключительно с использованием HB&L, приведены в таблице 2.

Таблица 1. Клинически значимые изоляты бактерий и дрожжей.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Тип образца** | **Кол-во образцов (%)** | **Кол-во положительных образцов, выявленных рутинным способов** | **Кол-во отрицательных образцов, выявленных рутинным способов** | **Кол-во положительных образцов, выявленных с использованием набора URO-QUICK**™ | **Кол-во отрицательных образцов, выявленных с использованием набора URO-QUICK**™ | **Согласие между URO-QUICK**™ **и рутинным методом** |
| Оротрахеальный аспират | 106 (19,4 %) | 96 | 10 | 96 | 10 | 0,99 |
| Бронхоальвеолярный лаваж | 63 (11 %) | 58 | 5 | 58 | 5 | 0,99 |
| Мокрота | 139 (25%) | 134 | 5 | 136 | 3 | 0,28 |
| Кровь | 47 (8%) | 0 | 47 | 29 | 18 | <0,0000005 |
| Плевральная жидкость | 105 (19%) | 18 | 87 | 24 | 81 | 0,30 |
| СМЖ | 26 (4,7%) | 0 | 26 | 2 | 24 | 0,49 |
| Перитонеальная жидкость | 41 (7,5%) | 14 | 27 | 16 | 25 | 0,49 |
| Другие жидкости | 19 (3,4 %) | 3 | 16 | 6 | 13 | 0,26 |
| **Итого:** | **546** | **323** | **223** | **367** | **179** | **0,007** |

44 бактериальных изолята были получены в ходе различных терапевтических процедур. Чувствительность и отрицательная прогностическая ценность, специфичность, а также положительная прогностическая ценность (PPV) были 100%. Общее микробное число, полученное с использованием HB&L, было сопоставимо с результатами в тех образцах, для исследования применялись оба метода. Кроме того, подсчет микробного числа из образцов из дыхательных путей был проще и менее трудоемким при использовании HB&L. Поскольку такие образцы обычно содержат конкурирующую нормальную флору, обнаружение значимого патогена может быть оценено только на твердой чашке с агаром после обогащения в HB&L.

**Микробный подсчет и результаты теста ОAA:** Информация, полученная из теста ОAA, также была полезна, особенно для жидких образцов, взятых из стерильных участков тела, включая СМЖ, плевральную жидкость, перитонеальную жидкость и кровь. Действительно, для этих образцов положительный тест на ОAA позволяет микробиологу решить, следует ли выполнять дальнейшие шаги, такие как разведение образцов в бульоне, для уменьшения или устранения неблагоприятного воздействия ранее введенных антибиотиков на восстановление бактерий. Для БАЛ положительный тест на ОAA позволяет микробиологу дополнить работу с образцом, по крайней мере провести идентификацию образца и чувствительность к антибиотикам для изолятов с низким микробным числом, когда общее микробное число ниже порога значимости. В этом исследовании тест на ОAA был выполнен на 472 из 546 образцов. Как описано выше, 74 образца, исключенные из исследования на ОAA, были теми, в которых объем материала для посева был недостаточным. Из 472 образцов 153 были ОАА-положительными и 319 ОАА-отрицательными. Из последних 75 (16%) не соответствовали назначеннойврачом терапии.

В результате чувствительность и отрицательная прогностическая ценность составили 67% и 76% соответственно. Среди 75 образцов, для которых тест на ОAA не соответствовал ожидаемому (то есть образцы, которые были отрицательными по ОAA, но которые были отобраны у пациентов, которые получали антимикробную терапию), антибиотикотерапия включала использование антимикотических препаратов (метронидазол или карбапенемы) или прием антибиотиков был начат или завершен в течение предыдущих 12 часов. В редких случаях дозы приема антибиотиков оказывались неоправданно низкими. Единственные два истинных случая не совпавших результатов включали две пробы СМЖ, взятые у пациентов, которые принимали ванкомицин. Полное совпадение наблюдалось между результатами теста на ОAA, выполненного на системе HB&L, и ожидаемыми результатами от пациентов, которые не проходили антибиотикотерапию. Ни один из образцов, которые должны были быть отрицательными по ОAA, не показал положительного результата. Специфичность и положительная прогностическая ценность теста на ОAA составляли 100%, тогда как чувствительность и отрицательная прогностическая ценность составляли 67% и 76% соответственно. Подсчет общего микробного числа, выполненный с использованием системы HB&L, показал отличное совпадение с данными, традиционного метода. В течение 235-минутного периода инкубации система HB&L также была способна поддерживать рост *H. influenzae* ATCC 49247, *N. lactamica* ATCC 23970 и *N. sicca* ATCC 9913 (данные не показаны). Для пациентов, чья инфекция была вызвана штаммом одного микроорганизма (например, в СМЖ и в крови), в конце 235-минутного времени инкубации и в случае положительного скрининга, идентификация и чувствительность к антибиотикам были выполнены непосредственно из собранного бактериального осадка из флакона HB&L на системе VITEK 2. Этот подход позволил нам представить предварительный отчет клиницисту через 16–18 часов по сравнению с 48 часами, которые обычно необходимы при использовании традиционного подхода.

Таблица 2. Бактериальные изоляты, полученные с использованием набора URO-QUICK™.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Тип образца** | **Кол-во образцов (%)** | **Положительные образцы, выявленные с использованием набора URO-QUICK**™ | **Штаммы** |
| Оротрахеальный аспират | 106 (19,4 %) | - |  |
| Бронхоальвеолярный лаваж | 63 (11%) | - |  |
| Мокрота | 139 (25%) | 2 (1,4%) | *Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* |
| Кровь | 47 (8%) | 29 (61%) | *Sphingomonas paucimobilis, Serratia marcesens, Staphylococcus hominis, Staphylococcus epidermidis SCV (n=5) \*, Staphylococcus aureus (n=2), P.aeruginosa (n=2), Oligela urealyticum, Micrococcus* *Luteus, Moraxella lacunata, Enterococcus faecalis (n=2), Escherichia coli (n=3), Corynebacterium profinquum, Corynebacterium jeikeium (n=2), Clostridium tyrobutiricum, Candida albicans, (n=2), Campylobacter jejunii, Acinetobacter haemolyticus* |
| Плевральная жидкость | 105 (19%) | 6 (5,7%) | *S. aureus, Rhodotorula glutinis, Bacillus pumilis, Burkholderia cepacian (n=2), Burkholderia gladioli* |
| СМЖ | 26 (4,7%) | 2 (7,6%) | *E. coli, S. aureus* |
| Перитонеальная жидкость | 41 (7,5%) | 2 (7,8%) | *Gemella morbillorium, Enterococcus avium* |
| Другие жидкости\*\* | 19 (3,4 %) | 3 (15,8%) | *Acinetobacter baumanni-Klebsiella pneumoniae, Pasteurella multocida, S.aureus* |
| **Итого:** | **546** | **44 (8.0%)** |  |

\* Небольшие колонии

\*\* Другие жидкости (всего 19), включая синовиальную жидкость (n = 5), асцитическую жидкость (n = 9), жидкости из дренажа инфицированного центрального венозного катетера (n = 3), брюшная дренажная жидкость (n = 1) и холецистичная жидкость (n = 1).

**Обсуждение**

В этом исследовании предлагается альтернативное использование хорошо известной системы HB&L. Система была разработана для проведения скрининга и тестов на ОAA в образцах мочи. Однако технология рассеяния света, а также очень высокое качество среды, содержащейся во флаконах, заставили нас рассмотреть вопрос о его применимости на других образцах, кроме мочи. Обогащение жидких образцов является значительным препятствием для эффективного и точного культивирования микроорганизмов, включая требовательные бактериальные патогены. Обычные методы культивирования могут не соответствовать условиям бактериального роста микроорганизмов; в образцах жидкостей человека, особенно стерильных, бактерии могут присутствовать в таких малых количествах, что единственный способ обеспечить выявление бактерий - это брать большой объем материала. Вот почему автоматизированная система культивирования крови была предложена в качестве надежной альтернативы традиционным методам культивирования. Несмотря на эти системы, лаборатория сталкивается с ограничением своих возможностей (особенно для некоторых жидких образцов, таких как СМЖ или некоторые БАЛ). Кроме того, для БАЛ оценка микробного количества также является фундаментальной, но не может быть сделана автоматизированными системами для культивирования крови. Дополнительные сложности представлены тем фактом, что большинство клинических биологических образцов отбирают у пациентов, проходящих антибиотикотерапию. Все еще активные лекарства могут подавлять рост бактерий, приводя к ложноотрицательным результатам. Поэтому использование системы, объединяющей в одном инструменте способность эффективно обогащать рост микроорганизмов, выявлять скрытый эффект антибиотика и достигать подсчета бактерий, крайне желательно. Настоящие результаты демонстрируют эквивалентность или превосходство системы HB&L по сравнению с традиционным подходом, основанным на культивировании, в росте клинически значимых микробов, включая требовательные бактерии или бактерии, рост которых изменен из-за воздействия антибиотиков. Важно отметить, что уникальное выявление клинически значимых микроорганизмов из 8% образцов является свидетельством сопоставимости HB&L с автоматизированным посевом крови и превосходством данного метода над посевом на чашку. Способность обогащенной среды анализаторов HB&L обеспечивать рост патогенных микроорганизмов из положительных культур крови, которые оказались отрицательными при традиционном посеве, демонстрирует высокое качество бульона. Интересно отметить, что некоторые бактерии, выделенные из таких культур крови, либо не являются распространенными изолятами, либо их трудно культивировать (например, *Staphylococcus epidermidis* Small Colony Variants, *Clostridium jeikeium*, *C. jejuni*). Кроме того, оценка количества микробов с помощью системы HB&L является точной, простой и менее трудоемкой, чем традиционные методы. Значение теста на ОAA также полезно. Превосходный PPV гарантирует отсутствие ложноположительных результатов, что позволяет микробиологу продолжить работу с такими БАЛ (которые отсекаются из-за слишком малого количества микробов по сравнению со пороговым значением). На NPV действительно влияли некоторые ложноотрицательные результаты, вероятно, из-за нарушений в схемах приема антибиотиков и из-за сниженной восприимчивости эталонного штамма *S. epidermidis* ATCC 12228, используемого для теста на ОAA. При дальнейшем уточнении с использованием более подходящих штаммов мы ожидаем, что этот недостаток будет преодолен. Особое внимание можно уделить рассмотрению двух истинных случаев ложноотрицательных результатов теста на ОAA. Они были получены в двух образцах СМЖ, собранных от пациентов, которые получали ванкомицин после неврологической операции. Ложноотрицательный результат может быть объяснен ограничением проникновения ванкомицина в СМЖ, что, возможно, привело к плохому росту контрольного штамма. Люмбальное или интравентрикулярное введение может быть показано некоторым пациентам. Следовательно, концентрация лекарственного препарата в БАЛ была, вероятно, слишком низкой для выявления анализатором.

Традиционная методика может быть ограничена чувствительностью метода; В образцах жидкости, особенно в стерильных жидкостях человеческого организма, бактерии могут присутствовать в таких малых количествах, что единственным способом, позволяющим их обнаружить, является посев большого объема материала. Кроме того, биологические образцы часто отбираются у пациентов, которые проходят курс лечения антибиотиками, что может привести к ложноотрицательным образцам. Методика, которой удается сопоставить способность к эффективному росту микроорганизмов путем выявления скрытого действия антибиотика с подсчетом общего количества микроорганизмов, крайне желательна. Результаты демонстрируют превосходство системы HB&L по сравнению с традиционной методикой в обнаружении возбудителей, в том числе прихотливых микроорганизмов или подавленных из-за воздействия антибиотиков. Выявление 8% клинически значимых штаммов, не обнаруженных с помощью традиционной методики на чашках Петри, свидетельствует о сопоставимости системы HB&L и автоматического посева крови, а также демонстрирует превосходство над классическими методами культивирования. Способность бульона HB&L накапливать патогенные микроорганизмы, выявленные в гемокультуре, но не на традиционных средах, демонстрирует высокое качество бульона. Значение теста ОАА было найдено полезным. Превосходное положительное прогностическое значение гарантирует отсутствие ложноположительных результатов (наличие факторов, препятствующих росту бактерий), что позволяет микробиологу продолжить анализ, особенно в отношении жидкостей дыхательных путей, которые в противном случае считаются недействительными на основании микробиологического подсчета. Повтор куска выше.

**Выводы**

Учитывая скорость, с которой система HB&L показала наличие положительных образцов в этом исследовании (235 мин – 6 ч), этот подход дает большие перспективы для непосредственного обнаружения и идентификации микробных патогенов и выявления их антимикробной восприимчивости. Это особенно важно для образцов из стерильных участков тела, где вполне возможно, что значимый патоген присутствует единичных количествах. Учитывая эту возможность, лаборатория может быстро подготовить предварительное заключение для врача. Своевременность этой информации может оказать большое значение для лечения пациентов и даже оказать влияние на их выживаемость. Наши результаты призывают к рассмотрению рутинного использования системы HB&L при культивировании биологических образцов в качестве эффективной альтернативы традиционному подходу.

**Подтверждения** Мы благодарны Alifax S.r.l. для предоставления контрольно-измерительных приборов и/или некоторых реагентов, используемых при исследовании. Мы благодарим Марко Пелличчиони, Ориану Чиккетти, Франческу Капальбо и Фабио Фальчионе за их ценную техническую помощь. Эта статья была рассмотрена BioMed Proofreading.

**Литература**

1. Akcam FZ, Yayli G, Usku E et al: Evaluation of Bactec microbial detection system for culturing miscellaneous sterile body ﬂ uids. Res Micr, 2006; 5: 433–36

2. Isemberg HD (ed.): Clinical Microbiology Procedures. ASM press Washington, DC; 1992; 1.4–1.9

3. Miller JM, Holmes HT, Krisher K: General Principles of specimen collection and handling. In: Murray P, Baron EJ, Jorgensen JH et al (eds.), Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2003; 1: 55–66

4. Bourbeau P, Riley J, Hetter BJ et al: Use of Bact/Alert blood culture system for culture of sterile body ﬂ uids other than blood. J Clin Microbiol, 1987; 36: 3273–77

5. Beveridge TJ: Use of the gram stain in Microbiology. Biotech Histochem, 2001; 76: 111–18

6. Miyashita N, Shimizu H, Ouchi K et al: Assessment of the usefulness of sputum Gram stain and culture for diagnosis of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Med Sci Monit, 2008; 14(4): CR171–76

7. Azap OK, Timurkaynak E, Sezer S et al: Value of automatized blood culture systems in the diagnosis of continuous ambulatory peritoneal dialysis peritonitis. Transplant Proc, 2006;

8. Brecher ME, Hay SN, Rothenberg SJ Validation of Bact/ALERT plastic culture bottles for use in testing of whole-blood derivated leukoreduced platelet-rich plasma-derived platelets. Transfusion, 2004; 44: 1174–78

9. Fuler DD, Davis TE: Comparison of Bactec Plus Aeobic/F, Anaerobic/ F, Ped Plus/F and Lytic/F media with and without fastidious organism supplement to conventional methods for culture of sterile body ﬂ uid. Diagn Microb Infect Dis, 1997; 29: 219–25

10. Fuller DD, Davis TE, Kibsey PC et al: Comparison of Bactec Plus 26 and 27 media with and without fastidious organism supplement with conventional methods for culture of sterile body ﬂ uids. J Clin Microb, 1994; 32: 1448–91

11. Fujitani S, Yu LV: Quantitative cultures for diagnosing ventilator-associated pneumonia: a critique. Clin Infect Dis, 2006; 43: 106–13

12. Guidelines for the management of adult with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia [editorial]. Am J Respir Crit Care, 2005, 171: 388–416

13. Marquette CH, Georges H, Wallet F et al: Diagnostic efﬁ ciency of endotracheal aspirates with quantitative bacterial cultures in intubated patients with suspected pneumonia: comparison with the protected specimens brush. Am Rev Respir Dis, 1993; 148: 138–44

14. Brouillete E, Martinez A, Boyll BJ et al: Persistence of Staphylococcus aureus small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. FEMS, 2004; 41: 35–41

15. Ling TKW, Liu ZK, Cheng AF: Evaluation of the VITEK 2 for rapid direct identiﬁ cation and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from positive blood cultures. J Clin Microbiol, 2003; 41: 4705–7

16. Saito T, Iinuma Y, Takakura S et al: Feasibility of ﬂ ow cytometry for the detection of bacteria from body ﬂ uid samples. J Infect Chemother, 2005; 11: 220–25

17. Le Monnier A, Carbonnelle E, Zahar JR et al: Microbiological diagnosis of empyema in children: comparative evaluation by culture, polymerase chain reaction, and pneumococcal antigen detection in pleural ﬂ uid. Clin Infect Dis, 2006; 42: 1135–40

18. Lutsar I, McCracken GH Jr, Friedland IR: Antibiotic pharmacodynamics in cerebrospinal ﬂ uid. Clin Infect Dis, 1998; 27: 1117–27