

Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний

Т.В. Припутневич¹, А.Р. Мелкумян¹, О.В. Бурменская¹,
О.С. Непша¹, И.В. Никитина¹, Л.А. Любасовская¹, О.В. Ионов¹,
Е.Н. Ильина², Д.Ю. Трофимов¹, С.Д. Митрохин¹

¹ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова»
Минздрава России, Москва, Россия

²ФГБУН «НИИ физико-химической медицины» ФМБА России, Москва, Россия

Цель исследования. Оценить возможности использования метода MALDI-TOF MS и экспериментальной тест-системы «Септи-панель», реализующей метод количественной ПЦР, при скрининге инфекционных агентов в гемокультуре.

Материал и методы. В исследование включено 50 проб крови, положительных по результатам культивирования (BactAlert, BioMerieux) 334 посевов крови от взрослых пациентов и новорожденных детей с подозрением на сепсис. Детекцию микроорганизмов проводили методами прямой масс-спектрометрии, количественной ПЦР, с использованием тест-системы «Септи-панель» и культуральным методом.

Результаты исследования. При тестировании 50 положительных гемокультур (во флаконах) методом прямой масс-спектрометрии идентифицировано до вида 76% микроорганизмов, методом количественной ПЦР — 92%. Положительный результат при одновременном использовании трех методов был получен в 66% случаев.

Выводы. Метод MALDI-TOF MS оказался достаточно быстрым и достоверным при диагностике септических состояний, вызванных одним возбудителем. Для повышения результативности метода необходимы дальнейшие разработки методики пробоподготовки и интерпретации результатов идентифицирования в программе BioTyper. ПЦР-диагностика с применением экспериментального набора «Септи-панель» позволит в кратчайшие сроки и с высокой точностью определять широкий спектр возможных патогенов в крови. Внедрение инновационных технологий тестирования возбудителя в образцах положительных гемокультур значительно сокращает время анализа, что позволяет клиницистам принимать своевременные и обоснованные решения по терапии септицемий.

Ключевые слова: инфекции крови, прямая масс-спектрометрия, пробоподготовка, количественная ПЦР.

Use of MALDI-TOF Mass-Spectrometry and Quantitative PCR for Rapid Diagnosis of Sepsis

T. V. Pripudnevich¹, A. R. Melkumyan¹, O. V. Burmenskaya¹, O. S. Nepsha¹,
I. V. Nikitina¹, L. A. Lyubasovskaya¹, O. V. Ionov¹, E. N. Ilyina², D. Yu. Trofimov¹, S. D. Mitrokhin¹

¹ Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after V.I. Kulakov, Moscow, Russia

² Scientific Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

Objective. To assess the use of MALDI-TOF MS and the experimental «Septi-Panel» assay (quantitative PCR method) in the screening of pathogens in blood culture.

Materials and Methods. A total of 50 positive blood cultures (BactAlert) obtained from adult patients and newborns with suspected sepsis were included in the study. Pathogen detection were performed by direct mass-spectrometry, quantitative PCR using «Septi-Panel» assay, and culture.

Results. Of 50 positive blood cultures tested, 76% and 92% of microorganisms were identified to species by direct mass-spectrometry and quantitative PCR, respectively. Positive result was yielded in 60% of cases when all three methods were used simultaneously.

Conclusions. MALDI-TOF MS was appeared to be rapid and reliable method in the diagnosis of sepsis caused by a single pathogen. In order to improve effectiveness of this method, further developments of sample preparation and interpretation methods using BioTyper software are needed. PCR method with experimental «Septi Panel» assay ensures very fast and accurate determination of a wide variety of possible pathogens in blood. Innovative pathogen testing technologies for positive blood cultures significantly reduces time of analysis which allows clinicians to make timely and reasonable decisions in the treatment of sepsis.

Key words: bloodstream infections, direct mass-spectrometry, sample preparation, quantitative PCR.

Введение

Септические осложнения являются одной из самых сложных проблем теоретической и практической медицины. В США ежегодно регистрируется 700 тыс. случаев сепсиса, т. е. около 2000 случаев ежедневно [1].

Сепсис — патологический процесс, в основе которого лежит реакция организма в виде генерализованного (системного) воспаления на инфекцию различной природы (бактериальной, вирусной, грибковой). Инфекции крови представляют серьезную угрозу для жизни человека и являются одной из дорогостоящих причин госпитализаций [2]. Учитывая стремительное развитие и высокую смертность от сепсиса, антимикробная химиотерапия препаратами широкого спектра действия часто назначается при первых клинических подозрениях на наличие инфекции. Невозможность быстрого выявления устойчивых штаммов патогенных бактерий приводит зачастую к применению неадекватных схем противомикробной терапии, что неэффективно, расточительно и несет в себе риск распространения резистентных штаммов. В эпоху нарастания лекарственной устойчивости ответственность за использование антибиотиков приобретает первостепенное значение.

С разработкой и развитием молекулярных методов тестирования появилась реальная возможность решения задач «быстрой микробиологии». Новые

способы мультиплексной ПЦР с использованием коммерческих тест-систем зарубежных производителей — LightCycler SeptiFast (Roche Diagnostics), Verigene Systeme (Nanosphere), FilmArray (Idaho Technology), GeneXpert DX (Cepheid), а также метод флуоресцентной гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* — RNA FISH (AdvanDX) дают возможность определения рода, вида и генетических детерминант резистентности наиболее распространенных возбудителей септицемий в течение 1–3 часов [3–8]. Молекулярные методы диагностики совершили определенный прорыв в микробиологии и детекции микроорганизмов в биологических образцах. Однако все же они имеют ряд недостатков, в первую очередь, это использование разработанных зондов в расчете на узкий спектр бактерий, дороговизна исследования и отсутствие регистрации большинства из этих технологий в РФ [3, 4].

В последние годы для решения стратегических вопросов современной микробиологии мощным инструментом в руках микробиологов становятся методы масс-спектрометрии, в частности *времяпролетной масс-спектрометрии* (MALDI TOF MS) [9]. В отличие от метода ПЦР, метод MALDI TOF MS может за несколько минут определить в одной пробе любой микроорганизм из более 4500 видов, имеющихся в его базе данных. Возможность прямого MS определения возбудителя в образцах положительных гемокультур значительно сокращает

время анализа [9,10] и является на сегодняшний день самым бюджетным методом идентификации.

Таким образом, одним из приоритетных направлений в диагностике септических состояний является быстрота выявления инфекционного агента, благодаря чему стартовая этиотропная терапия может стать реальностью.

Цель настоящего исследования — оценить возможности использования метода MALDI-TOF MS и экспериментальной тест-системы «Септи-панель», реализующей метод количественной ПЦР, при скрининге инфекционных агентов в гемокультуре.

Материал и методы

Исследование проводилось в период с ноября 2011 года по декабрь 2012 года. Было выполнено 334 посева крови при подозрении на сепсис у взрослых пациентов и новорожденных детей, находящихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России. В исследование включено 50 проб крови, отобранных во флаконы с углем и жидкой питательной средой для аэробного и анаэробного культивирования микроорганизмов, которые по предварительному результату в автоматизированной системе VactAlert (BioMerieux, Франция) с последующей прямой микроскопией были признаны положительными. Идентификацию микроорганизмов проводили в положительных образцах крови из флаконов методом прямого белкового профилирования с помощью масс-спектрометра Autoflex III (Bruker Daltonics, Германия).

Учитывая отсутствие на сегодняшний день стандартизованных протоколов пробоподготовки для проведения MALDI-TOF масс-спектрометрии, мы использовали собственную методику подготовки образца из флаконов с углем (BioMerieux, Франция). Для этого из флакона отбирали 1,5–2 мл гемокультуры, центрифугировали на скорости 15000 об/мин. в течение 20 мин. Затем осадок ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды, центрифугировали еще 10 мин. на скорости 5000 об/мин. Удаляли супернатант (надосадочную жидкость), а осадок повторно ресуспендировали и центрифугировали. Далее отбирали белесый осадок на угле, растворяли его в 1 мл дистиллированной воды и центрифугировали на максимальной скорости в течение 10 мин., с последующим ресуспендированием осадка в 1 мл 80% этанола и центрифугированием (10 мин. на скорости 15000 об/мин). Вновь образовавшийся осадок растворяли в 15 мкл деионизированной воды и 35 мкл муравьиной кислоты, а затем добавляли 50 мкл

ацетонитрила, образец центрифугировали на максимальной скорости 2 мин.

Полученный супернатант наносили на чип и покрывали 1 мкл матрицы, состоящей из альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты в виде насыщенных растворов в смеси 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты (Bruker Daltonics, Германия).

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, Германия). В соответствии с требованиями производителя, положительная идентификация на уровне рода считается при $score \geq 1,7$ и на уровне вида при $score = 2,0$ или выше. Однако, данная градация предназначена для видовой идентификации микроорганизмов, выделенных на плотных питательных средах. Поскольку на сегодняшний день отсутствуют референсные значения для видовой идентификации напрямую из гемокультур во флаконах, нами учитывались все результаты, начиная со значения $score=1,6$.

Параллельно с масс-спектрометрической идентификацией было проведено выявление микроорганизмов методом количественной ПЦР с использованием разработанной совместно коллективами отдела неонатологии, лабораторий микробиологии и молекулярно-генетических методов ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России диагностической тест-системы для научного применения «Септи-панель», содержащей праймеры 8 родов и 11 видов микроорганизмов. Для создания панели использовались праймеры, разработанные ООО «НПО ДНК-Технология», Россия. Перечень микроорганизмов в состав панели был включен на основании результатов многолетнего мониторинга за возбудителями инфекционных заболеваний, проводимого в лаборатории микробиологии ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России. Определяли следующие микробные агенты: *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae/Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter freundii*, *Burkholderia* spp., *Haemophilus* spp., *Candida* spp., *Candida albicans*.

Аmplификацию проводили на детектирующем амплификаторе «ДТ-964» («ДНК-Технология», Россия).

Референтным методом принято классическое культуральное исследование. Положительные образ-

цы крови из флаконов культивировали на плотных питательных средах (5% кровяной агар, шоколадный агар, маннит-солевой агар, среда Эндо) и агар Сабуро (Conda, Испания) с последующей видовой идентификацией возбудителей на масс-спектрометре Autoflex III (Bruker Daltonics, Германия).

Результаты исследований

По результатам посева из положительных образцов гемокультур было выделено 53 культуры микроорганизмов, в том числе 15 грамотрицательных бактерий: *E. coli* (5), *K. pneumoniae* (3), *K. oxytoca* (1), *E. cloacae* (3), *E. aerogenes* (1), *Acinetobacter baumannii* (1), *Raoultella ornithinolytica* (1); 34 грамположительных: *E. faecalis* (5), *E. avium* (1), *E. casseliflavus* (1), *S. warneri* (1), *S. parasanguinis* (1), *S. aureus* (5), *S. haemolyticus* (3), *S. hominis* (3), *S. epidermidis* (13), *Corynebacterium amycolatum* (1); 4 культуры дрожжевых грибов рода *Candida*: *C. albicans* (1) и *C. parapsilosis* (3). В 1 пробе был обнаружен рост двух видов бактерий (*S. epidermidis* и *S. parasanguinis*) и в 1 пробе рост трех видов (*S. epidermidis*, *A. baumannii*, *S. haemolyticus*).

При тестировании содержимого 50 флаконов с положительными гемокультурами методом прямой масс-спектрометрии удалось идентифицировать микроорганизмы в 38 образцах (38/50, 76%) и методом количественной ПЦР — в 46 образцах (46/50, 92%). Положительный результат, полученный одновременно при применении трех методов, был получен в 33 образцах (33/50, 66%) (таблица).

В результате ПЦР-анализа в четырех образцах был выявлен второй микроорганизм в низком титре, который не был обнаружен в гемокультуре методом MS и при культуральной диагностике. В 1 образце была обнаружена смесь двух культур (*Acinetobacter* spp. и метициллинорезистентный коагулазонегативный стафилококк [MRCoNS]), тогда как культуральным методом были определены три микроорганизма (*A. baumannii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*), а методом MS только один — *S. epidermidis*.

В 1 случае методом ПЦР была ошибочно типирована *Raoultella ornithinolytica* как *K. pneumoniae*, в 1 случае *E. aerogenes* — как *K. pneumoniae* из-за недостаточной специфичности праймеров, но стоит отметить, что на уровне семейства идентификация была проведена правильно (*Enterobacteriaceae*). В 2 случаях не удалось провести определение микроорганизмов методом количественной ПЦР в гемокультуре, что, вероятно, связано с применением антикоагулянтов, которые являются ингибиторами реакции. Двумя другими методами была идентифицирована культура *S. epidermidis*.

Лучше всего методом MS идентифицировались грамотрицательные микроорганизмы: в 13 из 14 образцов (92,9%) были получены совпадения результатов, тогда как из 30 культур грамположительных бактерий идентификация прошла в 23 случаях (76,6%).

Микроорганизмы, выявленные при посеве из гемокультуры на плотные питательные среды, прошли последующую идентификацию методом масс-спектрометрического анализа: в 86,8% случаев с высокой степенью достоверности — *score* $\geq 2,0$ и в 13,2% значения *score* составляли 1,9–1,7. Сравнительный анализ идентификации методом масс-спектрометрии культур, выращенных на плотных питательных средах и напрямую из флаконов с гемокультурами, показал, что при идентификации из флаконов степень достоверности (*score*) превышала значение 2,0 в 34% случаев.

Обсуждение результатов

Одной из целей данного исследования было оценить эффективность прямой идентификации бактерий во флаконах с гемокультурой с помощью MALDI-TOF MS. На сегодняшний день описаны различные алгоритмы прямой идентификации микроорганизмов в образцах с положительной гемокультурой с помощью MALDI-TOF MS и получены отличные друг от друга результаты. Серьезной проблемой является отсутствие стандартных протоколов пробоподготовки для идентификации бактерий непосредственно из гемокультур. Работы, выполненные с применением безугольных сред, демонстрируют более высокие показатели при идентификации, нежели при пробоподготовке образцов из флаконов, содержащих угольную среду [10–12]. Сложности интерпретации результатов связаны и с отсутствием в программе BioTyper рекомендаций по значениям достоверного *score* при идентификации бактерий из гемокультур. Для того чтобы увеличить результативность метода прямой идентификации из культур, некоторыми исследователями принимаются данные с меньшими значениями *score* (менее 1,9), чем при идентификации культур, выросших на плотных питательных средах. W. Moussaoui с соавт. [12] было предложено считать положительной идентификацию со значением *score*=1,7, при условии идентичности четырех последовательных предложений биотипа, что было использовано и в нашем исследовании. Тем самым, снижение порога идентификации бактерий на видовом уровне, по крайней мере, до 1,7, может оказаться приемлемым подходом на пути увеличения чувствительности прямого MALDI-TOF MS анализа гемокультуры [11,12].

Результаты идентификации микроорганизмов (n=53) при использовании трех методов

MALDI-TOF MS (культура)	Количество	MALDI-TOF MS (прямая идентификация)	Количество	ПЦР	Количество
Грамотрицательные бактерии					
<i>E. coli</i>	5	<i>E. coli</i>	4	<i>Enterobacteriaceae (E. coli)</i>	5
<i>K. pneumoniae</i>	3	<i>K. pneumoniae</i>	3	<i>K. pneumoniae/oxytoca</i>	3
<i>K. oxytoca</i>	1	<i>K. oxytoca</i>	1	<i>K. pneumoniae/oxytoca</i>	1
<i>E. cloacae</i>	3	<i>E. cloacae</i>	3	<i>E. cloacae</i>	3
<i>E. aerogenes</i>	1	<i>E. aerogenes</i>	1	<i>Enterobacteriaceae</i> (определена как <i>K. pneumoniae/oxytoca</i>)	0
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	<i>Enterobacteriaceae</i> (определена как <i>K. pneumoniae/oxytoca</i>)	0
Итого ...	14		13		12
Грамположительные бактерии					
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1	<i>Corynebacterium spp./ Mobiluncus spp.</i>	1
<i>S. aureus</i>	5	<i>S. aureus</i>	5	<i>S. aureus (MSSA)</i>	5
<i>S. epidermidis</i>	11	<i>S. epidermidis</i>	7	<i>Staphylococcus spp. (MRCoNS)</i>	7
<i>S. hominis</i>	3	<i>S. hominis</i>	2	<i>Staphylococcus spp. (MRCoNS)</i>	3
<i>S. haemolyticus</i>	2	<i>S. haemolyticus</i>	2	<i>Staphylococcus spp. (MRCoNS)</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	1 1
<i>S. warneri</i>	1	<i>S. warneri</i>	0	<i>Staphylococcus spp.</i>	1
<i>E. faecalis</i>	5	<i>E. faecalis</i>	4	<i>Enterococcus spp.</i>	5
<i>E. avium</i>	1	<i>E. avium</i>	1	<i>Enterococcus spp.</i>	1
<i>E. casseliflavus</i>	1	<i>E. casseliflavus</i>	1	<i>Enterococcus spp.</i>	1
Итого ...	30		23		26
Грибы					
<i>C. albicans</i>	1	<i>C. albicans</i>	0	<i>C. albicans</i>	1
<i>C. parapsilosis</i>	3	<i>C. parapsilosis</i>	1	<i>Candida spp. (C. albicans – отр.)</i>	3
Итого ...	4		1		4
Смешанные культуры					
<i>S. epidermidis + S. parasanguinis</i>	1 1	Отрицательная идентификация	0	<i>MRCoNS</i> <i>Streptococcus spp.</i>	1 1
<i>S. epidermidis + A. baumannii + S. haemolyticus</i>	1 1 1	<i>S. epidermidis</i>	1	<i>Acinetobacter spp. MRCoNS</i>	1 1

Метод MALDI-TOF MS оказался достаточно быстрым и достоверным при диагностике септических состояний, вызванных одним возбудителем. Для получения достоверного результата при состояниях, вызванных ассоциациями возбудителей, данный метод требует доработки, однако следует отметить, что такие состояния чаще связаны с контаминацией биоматериала и не всегда имеют этиологическую значимость.

ПЦР-диагностика с применением экспериментального набора «Септи-панель» показала, что комплексная одномоментная детекция микроорганизмов имеет практическую ценность и при дополнении ее праймерами грибов может позволить в кратчайшие сроки и с высокой точностью определять более широкий спектр возможных патогенов в крови.

Исследования в области диагностики тяжелых инфекционных патологий имеют важное значение

для практического здравоохранения. Необходимость дальнейших разработок в области мультиплексной ПЦР с возможностью детекции как инфекционных патогенов, так и наличия у них детерминант резистентности позволит российским производителям в будущем нарабатывать в промышленном масштабе

тест-системы с учетом распространенности резистентных штаммов на территории РФ, а клиницистам принимать своевременные и обоснованные решения по терапии септицемий и тем самым возможность спасти тысячи жизней.

Работа частично поддержана Государственным контрактом Министерства образования и науки РФ № 16.522.12.2009 от 29.09.2011

Литература

1. Angus D.C. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29(7):1303-10.
2. Elixhauser A., Friedman B., Stranges E.. Septicemia in US Hospitals, 2009. HCUP Statistical Brief 2011; 122. Agency for Healthcare Research and Quality.
3. Володин Н.Н., Дегтярева Л.А., Кафарская Л.И. и соавт. Использование молекулярно-генетических технологий, основанных на полимеразной цепной реакции, в диагностике инфекционных заболеваний у новорожденных. *Вопросы практической педиатрии* 2010; 5(4):39-46.
4. Venkatesh M., Flores A., Luna R.A., Versalovic J. Molecular microbiological methods in the diagnosis of neonatal sepsis. *Expert Rev Anti Infect* 2010; 8(9):1037-48.
5. Wolk D., Hilbert L. Rapid identification using PNA FISH. *Clinical Laboratory News: Bloodstream Pathogens* 2011; 37(5).
6. Mencacci A., Leli C., Cardaccia A., et al. Comparison of conventional culture with SeptiFast real-time PCR for microbial pathogen detection in clinical specimens other than blood. *J Med Microbiol* 2011; 60:1774-8.
7. Maes N., Magdalena J., Rottiers S., De G.Y., Struelens M.J. Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci and determine methicillin resistance from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1514-7.
8. Lehmann L.E., Hunfeld K.P., Emrich T., et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol* 2008; 197:313-24.
9. Klein S., Zimmermann S., Kohler C., Mischnik A., et al. Integration of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in blood culture diagnostics: a fast and effective approach. *J Med Microbiol* 2012; 61(3):323-31.
10. Emonet S., Shah H.N., Cherkaoui A., Schrenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infection* 2010; 16(11):1604-13.
11. Szabados F., Michels M., Kaase M., Gatermann S. The sensitivity of direct identification from positive *BacT/ALERT (bioMerieux)* blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:192-5.
12. Moussaoui W., Jaulhac B., Hoffmann A. M., Ludes B., Kostrzewa M., Riegel P. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:1631-8.