

Попов Д.А., Надточей Е.А.

АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИЕМИИ У КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ В ОРИТ

ФГБУ «НМИЦ сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева»
Минздрава России, 121552, Москва

Цель. Оценить результаты идентификации положительных гемокультур методом MALDI-ToF MS после их краткосрочного субкультивирования на плотных питательных средах с разработкой оптимального алгоритма диагностики бактериемии.

Материал и методы. В проспективное исследование включено 500 положительных гемокультур, полученных в период с января 2015 по ноябрь 2016 гг. от 287 кардиохирургических пациентов (242 взрослых и 45 детей) в возрасте от 1 нед. до 83,5 лет. Взятие проб крови производили в стандартные флаконы с сорбентом для антибиотиков, инкубацию которых осуществляли в аппарате BacT/ALERT 3D 120 (bioMérieux, Франция). В параллели с рутинным методом идентификации гемокультур (субкультивирование положительной гемокультуры в течение 16–18 ч. с последующим MALDI-ToF MS-анализом, Vitek MS (bioMérieux, Франция), образцы высевали на подогретый кровяной агар с последующей инкубацией при 37°C (максимально – до 6 ч). При выявлении визуально определяемого роста микроорганизмов выполняли их идентификацию с помощью метода MALDI-ToF MS.

Результаты. Среднее время инкубации крови до выявления роста положительных гемокультур составило 18 ч (от 4,3 до 96 ч). При этом рост грамотрицательных бактерий регистрировался статистически значимо раньше, чем грамположительных кокков и дрожжеподобных грибов (13,7 ч (от 4,3 до 68,1 ч) против 16,5 ч (от 5 до 86,6 ч), $p = 0,02$ и 32,5 ч (от 12 до 96 ч), $p = 0,01$ соответственно). После краткосрочного (до 6 ч) субкультивирования на кровяном агаре монокомпонентных гемокультур ($n = 475$) методом MALDI-ToF MS было идентифицировано 437 (92%) микроорганизмов. При этом доля успешной видовой идентификации составила 98% для грамотрицательных бактерий, 94% для грамположительных кокков и 47% для дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Не удалось идентифицировать 38 микроорганизмов: *C. parapsilosis* ($n = 13$), *S. epidermidis* ($n = 7$), *C. albicans* ($n = 4$), *S. haemolyticus* ($n = 4$), *S. hominis* ($n = 3$), *S. marcescens* ($n = 2$), *S. aureus* ($n = 1$), *S. sciuri* ($n = 1$), *E. faecium* ($n = 1$), *C. tropicalis* ($n = 1$) и *P. mirabilis* ($n = 1$). Среди включённых в исследование образцов было 25 ассоциаций из двух микроорганизмов, при анализе которых методом MALDI-ToF MS в 21 случае (84%) до вида был определен один микроорганизм из ассоциации, ещё в 1 случае – оба микроорганизма (за счёт постановки теста в двух повторностях). При анализе трёх смешанных культур результат идентификации отсутствовал.

Вывод. Применение метода краткосрочного субкультивирования положительных гемокультур с последующей их идентификацией с помощью MALDI-ToF MS позволяет быстро и надёжно идентифицировать возбудителей бактериемии, что при использовании данных локального микробиологического мониторинга может способствовать раннему началу адекватной антибиотикотерапии.

Ключевые слова: бактериемия; инфекционные осложнения; MALDI-ToF масс-спектрометрия.

Для цитирования: Попов Д.А., Надточей Е.А. Алгоритм диагностики бактериемии у кардиохирургических больных в ОРИТ. Анестезиология и реаниматология. 2017; 62(5): 382-387. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0201-7563-2017-62-5-382-387>

Popov D.A., Nadtochey E.A.

ALGORITHM OF BACTEREMIA DIAGNOSTIC IN CARDIOSURGICAL PATIENTS IN ICU

A.N. Bakulev National Scientific and Practical Center for Cardiovascular Surgery,
Moscow, 121552, Russian Federation

Objective. To evaluate the results of positive blood cultures identification by MALDI-ToF MS after short-term subcultivation and to develop an optimal algorithm for diagnosis of bacteremia.

Material and Methods. A prospective study includes 500 positive blood cultures obtained between January 2015 and November 2016 from 287 cardiosurgical patients (242 adults and 45 children) aged from 1 week up to 83.5 years. Blood samples were taken using standard vials with sorbent for antibiotics and processed in BacT/ALERT 3D 120 incubator (bioMérieux, France). In parallel with the routine method (subcultivation of positive blood cultures during 16-18 h. followed by MALDI-ToF MS-analysis, Vitek MS (bioMérieux, France), the samples were plated on warmed-up blood agar, followed by incubation up to 6 h. at 37°C. When a visually determined growth of microorganisms detecting the samples were identified using the MALDI-ToF MS.

Results. Mean blood samples incubation time before growth detection was 18 h. (from 4.3 to 96 h.). The growth of Gram-negative bacteria was registered significantly earlier than Gram-positive cocci and yeasts (13.7 h. (from 4.3 to 68.1 h.) vs. 16.5 h. (from 5 to 86.6 h.), $p=0,02$ and 32.5 h. (from 12 to 96 h.), $p=0,01$, respectively. After short-term (up to 6 h.) subcultivation of monocomponent hemocultures ($n=475$), 437 out of them were identified by the MALDI-ToF MS method (92%). The rate of successful identification was 98% for Gram-negative bacteria, 94% for Gram-positive cocci and 47% for yeasts. There were no identification of 38 microorganisms: *C. parapsilosis* ($n=13$), *S. epidermidis* ($n=7$), *C. albicans* ($n=4$), *S. haemolyticus* ($n=4$), *S. hominis* ($n=3$), *S. marcescens* ($n=2$), *S. aureus* ($n=1$), *S. sciuri* ($n=1$), *E. faecium* ($n=1$), *C. tropicalis* ($n=1$) and *P. mirabilis* ($n=1$). There were 25 associations of two microorganisms in the studied 500 samples. By MALDI-ToF MS in 21 cases (84%) one microorganism from the association were identified, in another case – both microorganisms (due to testing in two replicates); in 3 cases the results were absent.

Conclusion. The method of short-term subcultivation of positive blood cultures with subsequent identification by

MALDI-ToF MS allows to quickly and reliably identify the causative agents of bacteremia, which can contribute to the early onset of adequate antibiotic therapy with the use of local microbiological monitoring data.

Keywords: *bacteremia; infectious complications; MALDI-ToF mass spectrometry.*

For citation: Popov D.A., Nadochey E.A. Algorithm of bacteremia diagnostic in cardiosurgical patients in ICU. *Anesteziologiya i Reanimatologiya (Russian Journal of Anaesthesiology and Reanimatology)* 2017; 62(5): 382-387. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0201-7563-2017-62-5-382-387>

Equity participation of the authors: PDA – the formation of the research conception, data processing, writing of the article; NEA – the data collection.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study is executed at financial support of the President's of the Russian Federation Grant (MD-6572.2016.7).

Received 10 May 2017

Accepted 28 August 2017

Введение. Ранняя этиотропная антибиотикотерапия является одним из важнейших условий снижения летальности при тяжёлых инфекциях и сепсисе [1]. В значительном числе случаев такие инфекции протекают с бактериемией, что делает очень важным аспект её максимально быстрой этиологической диагностики. На протяжении последних лет достигнут существенный технологический прогресс в этой области, причём как в направлении совершенствования традиционных методов гемокультивирования (внедрение автоматических инкубаторов, осуществляющих непрерывный мониторинг роста гемокультуры), так и за счёт разработки некультуральных способов диагностики (мультиплексный ПЦР-анализ в режиме реального времени, FISH-гибридизация, магнитный резонанс и др.) [2–5]. Несмотря на быстроту получения результата, некультуральные способы характеризуются рядом недостатков, к наиболее существенным из которых следует отнести ограниченный перечень идентифицируемых микроорганизмов, а также высокую стоимость анализа, в связи с чем традиционный бактериологический метод на сегодняшний день остается «золотым стандартом» [6].

Современные инкубаторы гемокультур за счёт применения обогащенных питательных сред, содержащих в ряде случаев сорбенты для антибиотиков, в более чем 90% случаев позволяют определить рост гемокультуры в пределах первых суток проведения исследования. Далее первичную гемокультуру микроскопируют с окраской по Граму и высевают на плотные дифференциально-диагностические питательные среды с целью получения чистых суточных культур для их последующей идентификации (наиболее часто – по биохимическим признакам) и определения чувствительности к антимикробным препаратам. Суммарное время от взятия крови на исследование до получения результата идентификации возбудителя при этом обычно составляет около 3 сут. [7].

Матричная лазерная десорбционная ионизационная времяпролётная масс-спектрометрия (MALDI-ToF MS) является новым, применительно к бактериологии, методом, позволяющим путем анализа спектра константных рибосомальных белков с высокой специфичностью осуществлять идентификацию чистых культур микроорганизмов всего за несколько минут. Этот метод также позволяет осуществлять прямое исследование некоторых субстратов (мочи, первичной бульонной гемокультуры) после сравнительно несложной пробоподготовки, требующейся для очистки исследуемого материала от посторонних примесей. Кроме того, возможен анализ «молодых» культур после краткосрочного субкультивирования исследуемого материала на плотных питательных средах [8, 9].

Для корреспонденции:

Попов Дмитрий Александрович, доктор мед. наук, рук. лаб. клинической микробиологии и антимикробной терапии ФГБУ «НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева» Минздрава России, 121552, Москва. E-mail: da_popov@inbox.ru

For correspondence:

Dmitry A. Popov, MD, PhD, DSc, Head of The Laboratory of Clinical Microbiology and Antimicrobial Therapy, A.N. Bakulev National Scientific and Practical Center for Cardiovascular Surgery, Moscow, 121552, Russian Federation. E-mail: da_popov@inbox.ru

Помимо совершенствования микробиологической составляющей, очевидно, что эффективная диагностика бактериемии невозможна без строгого соблюдения показаний к выполнению исследования крови на стерильность, правильности взятия и сроков доставки материала в лабораторию и ряда других аспектов [10].

Целью настоящего исследования являлась оценка результатов идентификации положительных гемокультур методом MALDI-ToF MS после их краткосрочного субкультивирования на плотных питательных средах с разработкой оптимального алгоритма диагностики бактериемии.

Материал и методы. В период с января 2015 по ноябрь 2016 гг. в проспективное исследование последовательно включено 500 положительных гемокультур, полученных от 287 кардиохирургических пациентов (242 взрослых и 45 детей) в возрасте от 1 нед. до 83,5 лет, находящихся в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Среди больных, включенных в исследование, было 23 пациента с активным инфекционным эндокардитом. Показаниями для исследования было наличие клинико-лабораторных признаков системного воспаления в сочетании с подтвержденным или предполагаемым очагом инфекции.

Взятие крови осуществлялось путем периферической венопункции в парные аэробные флаконы для гемокультивирования, содержащие сорбент для антибиотиков в виде латексных частиц, позволяющий повысить вероятность выделения возбудителя у больных, получающих антимикробную терапию. При выполнении исследования у взрослых больных в каждый флакон (VacT/ALERT FA Plus, bioMérieux, Франция) вносили по 10 мл крови, что является оптимальным для обеспечения максимальной чувствительности метода. У детей использовали специальные педиатрические флаконы (VacT/ALERT PF Plus, bioMérieux, Франция), позволяющие исследовать малые образцы крови (1–5 мл). У больных с инфекционным эндокардитом взятие проб крови осуществлялось трижды с интервалом 30 мин из разных вен, причём в парах использовались флаконы для аэробного (VacT/ALERT FA Plus, bioMérieux, Франция) и анаэробного (VacT/ALERT FN Plus, bioMérieux, Франция) гемокультивирования. После инокуляции флаконы доставлялись в лабораторию, где осуществлялась их инокуляция с применением автоматической системы VacT/ALERT 3D 120 (bioMérieux, Франция). Такая система с помощью колориметрического сенсора, вмонтированного в дно флакона для посева крови, позволяет в автоматическом режиме определять рост гемокультуры путем прямого мониторинга продукции диоксида углерода, концентрация которого увеличивается при росте микроорганизмов. После получения сигнала о росте гемокультуры соответствующие флаконы выгружали из инкубатора, после чего делали мазок содержимого с окраской по Граму для микроскопического исследования с последующим высевом первичной бульонной гемокультуры на плотные питательные среды. После получения чистых суточных культур микроорганизмов их идентифицировали методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролётной масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS) по стандартной методике (Vitek MS, bioMérieux, Франция). При этом исследуемую культуру в двух повторностях наносили на одноразовый слайд, после чего немедленно добавляли 1 мкл специального реагента – матрикса (α -циано-4-гидроксикоричная кислота), поглощающего энергию лазерного излучения. Исследование культур грибов перед нанесением матрикса включало в себя дополнительный этап экстракции белков муравьиной кислотой.

Таблица 1

Результаты идентификации гемокультур методом MALDI-ToF MS после сокращённого субкультивирования, n = 475

Микроорганизм	n	Успешная идентификация, n (%)	Время субкультивирования, ч [M (min–max)]
Грамположительные	294	277 (94)	3,9 (3–6)
Стафилококки:	227	211 (93)	3,9 (3–6)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	101	94 (93)	4 (3–6)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	50	46 (92)	4 (3–6)
<i>Staphylococcus hominis</i>	38	35 (92)	4 (3–6)
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	36 (97)	3,2 (3–4)
<i>Staphylococcus sciuri</i>	1	0 (0)	6
Энтерококки:	46	45 (98)	3,7 (3–4,5)
<i>Enterococcus faecium</i>	24	23 (96)	3,8 (3–4,5)
<i>Enterococcus faecalis</i>	21	21 (100)	3,6 (3–4,5)
<i>Enterococcus durans</i>	1	1 (100)	3,5
Прочие грамположительные	21	21 (100)	4 (3–6)
Грамотрицательные	147	144 (98)	2,7 (1,5–5,5)
Энтеробактерии:	87	84 (96,5)	2,5 (1,5–5,5)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	49	49 (100)	2,1 (1,5–3)
<i>Serratia marcescens</i>	14	12 (86)	3,7 (2–5,5)
<i>Enterobacter cloacae</i>	8	8 (100)	2,7 (2–4)
<i>Escherichia coli</i>	9	9 (100)	2,5 (1,5–3)
<i>Citrobacter freundii</i>	6	6 (100)	4 (3–5)
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0 (0)	6
Неферментирующие:	60	60 (100)	2,9 (1,5–5)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	33	33 (100)	2,6 (1,5–3)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	11	11 (100)	3,4 (2–5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	11 (100)	3 (2–5)
<i>Burkholderia gladioli</i>	2	2 (100)	4 (4–4)
<i>Delftia acidovorans</i>	1	1 (100)	4
<i>Pseudomonas putida</i>	1	1 (100)	4
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1	1 (100)	4
Грибы:	34	16 (47)	5 (4–6)
<i>Candida parapsilosis</i>	25	12 (48)	5,2 (4–6)
<i>Candida albicans</i>	5	1 (20)	5,4 (5–6)
<i>Candida tropicalis</i>	4	3 (75)	5 (5–5)
Всего...	475	437 (92)	3,6 (1,5–6)

После высушивания слайда с нанесёнными образцами при комнатной температуре его помещали в вакуумную камеру MALDI-ToF масс-спектрометра, после чего с каждого образца снимали до 100 белковых масс-спектров, при соотнесении которых с компьютерной базой данных выдавался результат идентификации микроорганизма-возбудителя. Прибор работает в автоматическом режиме, время, затрачиваемое на сканирование одного спота, составляет менее 1 мин.

Параллельно с данным рутинным методом после микроскопии первичных гемокультур производился их высев на подогретый до 37 °С кровяной агар. В ходе последующего субкультивирования, начиная с третьего часа инкубации, образцы просматривали в отражённом свете каждый час на предмет выявления визуально заметного роста микроорганизмов, после чего производилась их идентификация с помощью MALDI-ToF масс-спектрометрии в последовательности, описанной выше.

По факту выявления положительной гемокультуры, а также при получении результатов идентификации возбудителя

и определении его чувствительности к антибиотикам, врач-бактериолог немедленно передавал лечащему врачу больного соответствующую информацию (по телефону, через систему автоматизированной истории болезни) для своевременной коррекции режимов терапии.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием программ Statistica 7 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде абсолютных значений и долей, а также медианы, минимума и максимума. Для выявления статистически значимых различий при сравнении групп данных использован метод Манна–Уитни. Различия в сравниваемых группах при $p < 0,05$ приняты статистически значимыми.

Результаты. Среднее время инкубации образцов крови пациентов до выявления роста положительных гемокультур составило 18 ч (от 4,3 до 96 ч). При этом рост грамотрицательных бактерий регистрировался статистически значимо раньше, чем грамположительных кокков и дрожжеподобных грибов (13,7 ч (от 4,3 до 68,1 ч)) против 16,5 ч (от 5 до 86,6 ч), $p = 0,02$ и 32,5 ч (от 12 до 96 ч), $p = 0,01$ соответственно. В итоге 89,5% положительных гемокультур было выявлено уже в первые сутки инкубации исследуемых образцов.

При микроскопическом исследовании мазков из первичных бульонных гемокультур 475 образцов из 500 (95%) оказались монокомпонентными, остальные 25 были представлены микробными ассоциациями, состоящими из микроорганизмов двух видов. С использованием рутинного метода идентификации в монокомпонентных гемокультурах было выделено 28 видов микроорганизмов: грамположительных – 294 (62%), грамотрицательных – 147 (31%), грибов рода *Candida* – 34 (7%) – табл. 1.

После краткосрочного (до 6 ч) субкультивирования первичных гемокультур на плотных питательных средах с помощью масс-спектрометра суммарно до вида было идентифицировано 437/475 (92%) монокомпонентных образцов. При этом доля успешной видовой идентификации составила 98% для грамотрицательных бактерий, 94% для грамположительных кокков и 47% для дрожжеподобных грибов рода *Candida*. В указанный временной промежуток не удалось идентифицировать 38 микроорганизмов: *C. parapsilosis* ($n = 13$), *S. epidermidis* ($n = 7$), *C. albicans* ($n = 4$), *S. haemolyticus* ($n = 4$), *S. hominis* ($n = 3$), *S. marcescens* ($n = 2$), *S. aureus* ($n = 1$), *S. sciuri* ($n = 1$), *E. faecium* ($n = 1$), *C. tropicalis* ($n = 1$) и *P. mirabilis* ($n = 1$) – см. табл. 1.

Программное и аппаратное обеспечение использованного в настоящем исследовании MALDI-ToF масс-спектрометра позволяет надёжно идентифицировать монокультуры. Среди включенных в исследование образцов было 25 ассоциаций из двух микроорганизмов, при анализе которых методом MALDI-ToF MS в 21 случае (84%) до вида был определён один микроорганизм из ассоциации, ещё в 1 случае – оба микроорганизма. Это происходило за счет постановки теста в двух повторностях вследствие превалирования спектров, характерных для того или иного компонента микробной ассоциации. При анализе трёх смешанных культур результат идентификации отсутствовал (табл. 2).

Обсуждение. В настоящее время доказано, что результат лечения тяжёлых инфекций (а инфекции, протекающие с бактериемией, безусловно, относятся к данной категории), в существенной мере определяется минимизацией интервала между постановкой диагноза и назначением адекватного антимикробного препарата [1]. В связи с этим важность этиологической диагностики бактериемии сложно переоценить, особенно в условиях нарастающей устойчивости микроорганизмов к антибиотикам. И если вопрос эффективной инкубации крови является уже практически решённым, то последующие этапы, базирующиеся на применении надёжных, но медленных тради-

Результаты идентификации с помощью MALDI-ToF MS положительных гемокультур, представленных микробными ассоциациями, после краткосрочного субкультивирования

Рутинный метод	Сокращенное субкультивирование
<i>A. baumannii</i> + <i>E. faecium</i>	<i>A. baumannii</i> + <i>E. faecium</i>
<i>A. baumannii</i> + <i>E. faecalis</i>	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> + <i>E. faecalis</i>	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> + <i>S. haemolyticus</i>	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> + <i>S. haemolyticus</i>	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> + <i>S. haemolyticus</i>	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> + <i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>
<i>B. gladioli</i> + <i>S. epidermidis</i>	<i>B. gladioli</i>
<i>E. cloacae</i> + <i>S. haemolyticus</i>	<i>E. cloacae</i>
<i>E. cloacae</i> + <i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>
<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. faecium</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>P. putida</i> + <i>S. hominis</i>	<i>P. putida</i>
<i>S. marcescens</i> + <i>E. faecalis</i>	<i>S. marcescens</i>
<i>S. marcescens</i> + <i>E. faecium</i>	<i>S. marcescens</i>
<i>E. faecalis</i> + <i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>E. faecalis</i> + <i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>E. faecalis</i> + <i>S. haemolyticus</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>E. faecalis</i> + <i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
<i>E. faecium</i> + <i>A. baumannii</i>	<i>E. faecium</i>
<i>E. faecium</i> + <i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecium</i>
<i>E. faecium</i> + <i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecium</i>
<i>S. sciuri</i> + <i>S. maltophilia</i>	<i>S. sciuri</i>
<i>A. baumannii</i> + <i>S. haemolyticus</i>	Нет идентификации
<i>A. baumannii</i> + <i>S. epidermidis</i>	Нет идентификации
<i>C. parapsilosis</i> + <i>S. maltophilia</i>	Нет идентификации

ционных бактериологических методов, до недавнего времени оставались «слабым звеном».

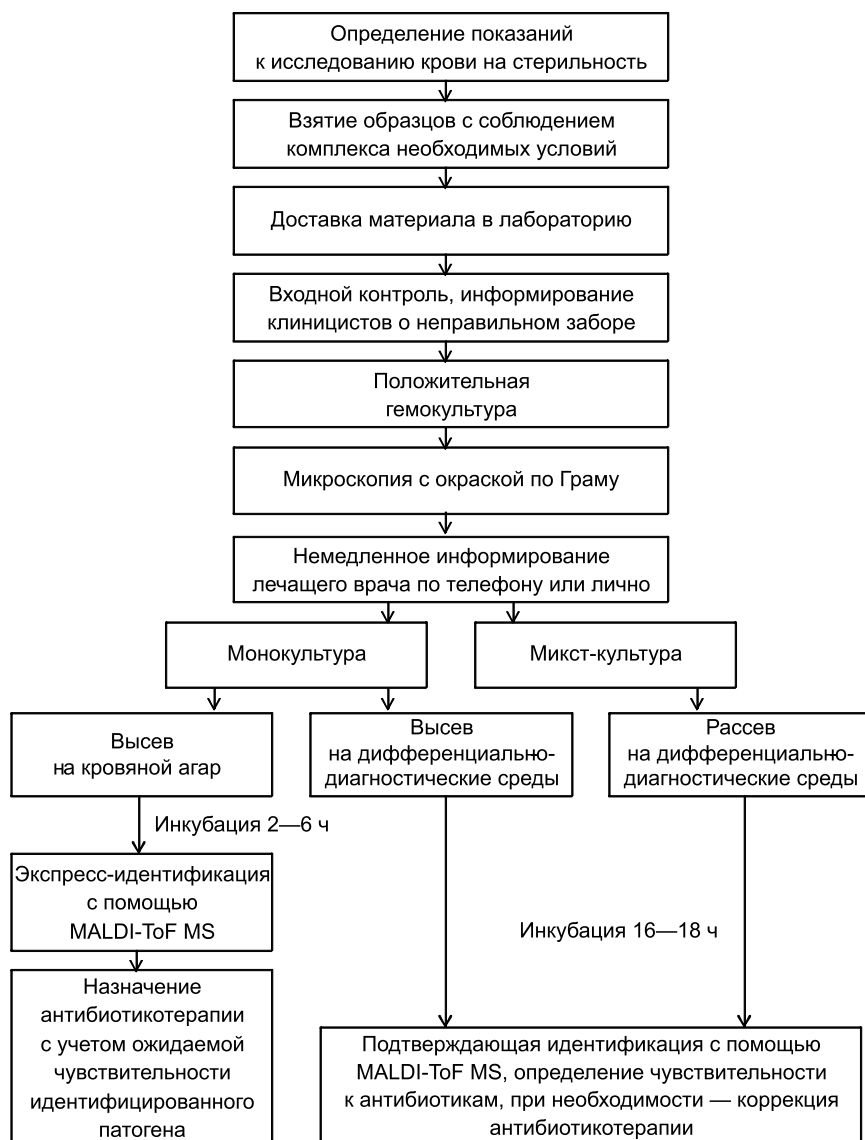
Очевидная потребность во внедрении в практику быстрых методов идентификации патогенов обусловила появление ряда разработок, позволяющих ускорить диагностику бактериемии. К таким способам можно отнести использование «быстрых» панелей для определения микроорганизмов по их биохимическим признакам, ряд некультуральных методов на основе полимеразной цепной реакции и некоторые другие. Адаптация технологии MALDI-ToF масс-спектрометрии, не имеющей себе равных по скорости получения результата, к процессу идентификации гемокультур позволила вывести проведение данного анализа на качественно новый уровень. Основной проблемой непосредственного исследования биосубстратов методом MALDI-ToF масс-спектрометрии является наличие в них различных примесей (применительно к гемокультурам – компонентов питательной среды, клеток крови и клеточного детрита, белков плазмы крови, сорбентов и др.), затрудняющих или делающих невозможным проведение анализа. В настоящее время известен целый ряд способов, когда путем различных вариантов пробоподготовки образца первичной гемокультуры (бульона из «положительно-го» флакона) получают очищенный экстракт микробных белков, пригодный для исследования методом MALDI-ToF масс-спектрометрии, при этом время от выявления роста крови до получения результата идентификации патогена составляет около 1 ч. Несмотря на это безусловное преимущество, все методы на основе экстракции белков характеризуются необходимостью наличия специальных навыков у лаборантов, а также пусть небольшими, но дополнительными материальными затратами на реагенты и оборудование [11]. Поэтому несомненный интерес представляет собой возможность использования в качестве субстрата для MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа «молодых» культур микроорганизмов, получаемых в течение нескольких часов после посева первичной гемокультуры на подогретую плотную питательную среду (кровяной агар).

Результаты, полученные в настоящем исследовании, показывают, что такие клинически важные патогены, как грамотрицательные бактерии, являющиеся наиболее частыми возбудителями нозокомиальных инфекций, сепсиса и септического шока, могут быть идентифицированы в первичной положительной гемокультуре менее, чем за 3 часа с уровнем достоверности результата в 98%. Около 4 часов было необходимо для определения этиологии бактериемии, вызванной грамположительными кокками (см. табл. 1). Применение метода сокращенного субкультивирования при фунгемиях было менее эффективным – в течение рабочего дня оказалось возможным идентифицировать порядка половины случаев. В данной ситуации целесообразно использование альтернативных методов. Полученные нами данные согласуются с результатами, полученными другими исследователями. Так, в частности, по данным Idelevich E.A. с соавторами в течение первых 6 ч. субкультивирования первичных гемокультур на подогретом кровяном агаре удалось идентифицировать до вида 97,6% грамотрицательных бактерий и 64% грамположительных кокков [12].

Автоматические анализаторы позволяют выявлять положительные гемокультуры круглосуточно, однако режим работы большинства бактериологических лабораторий, как правило, закрытых в ночное время и выходные дни, может существенно нивелировать это преимущество. В этой связи могло бы быть целесообразным размещение инкубатора гемокультур в подразделениях с непрерывным

рабочим графиком (например, в экспресс-лаборатории), однако это может вступать в противоречие с действующими в нашей стране санитарными правилами (работы с патогенными биологическими агентами должны производиться в лаборатории, имеющей соответствующее санитарно-эпидемиологическое заключение). Компромиссным решением может быть использование удаленного доступа к лабораторной информационной системе, в том числе, позволяющей обеспечить активное информирование персонала бактериологической лаборатории о выявлении положительной гемокультуры, например, путем автоматической отправки смс-сообщений.

Следует заметить, что даже оперативно полученные данные микробиологических исследований не всегда трансформируются в принятие того или иного клинического решения. Это связано с рядом обстоятельств, среди которых можно отметить отсутствие достаточного уровня взаимодействия между лабораторией и клиникой, недооценку лечащими врачами важности микробиологических данных, во многом определяющих исход заболевания, а также устоявшееся мнение, что результаты бактериологических исследований могут быть получены не ранее, чем через несколько дней. В настоящее время доказано, что снижение летальности у пациентов с бактериемией возможно лишь при интеграции быстрых методов этиологической диагностики в систему управления антибиотикотерапией [13, 14].



Алгоритм исследования крови на стерильность.

С учетом существующих клинических рекомендаций, а также опыта, накопленного в процессе научно-практической работы, авторами этой статьи был предложен соответствующий клинико-лабораторный алгоритм (см. рисунок), позволяющий оптимизировать исследование крови на стерильность. Ряд клинических аспектов (определение показаний к исследованию крови на стерильность, правила взятия материала на исследование, его маркировки и доставки в лабораторию и др.) при этом намеренно опущен, так как подробно изложен в соответствующих документах [10]. Выбор режимов антибиотикотерапии осуществляется с обязательным использованием данных локального микробиологического мониторинга, включающего информацию о вероятной чувствительности к антибиотикам соответствующих патогенов и дополняющего экспресс-методы идентификации гемокультур [15]. Также показана возможность исследования чувствительности гемокультур к антибиотикам с помощью стандартных карт, применяемых в микробиологических анализаторах, при использовании «молодых» микробных культур [16].

Заключение

Быстрая и надёжная идентификация возбудителей бактериемии с последующим назначением целенаправлен-

ной антибиотикотерапии имеют решающее значение в обеспечении благоприятного исхода заболевания. Применение современных экспресс-методов на основе MALDI-ToF масс-спектрометрии позволяет значительно ускорить определение этиологии инфекций кровотока, способствуя улучшению результатов лечения больных как в клиническом, так и в экономическом аспектах.

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (МД-6572.2016.7).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Долевое участие авторов. ПДА – формирование концепции исследования, обработка материала, написание статьи; НЕА – сбор материала.

ЛИТЕРАТУРА

(п.п. 1–6, 10, 12–14, 16 см. REFERENCES)

- Багирова Н.С., Дмитриева Н.В. *Диагностика инфекций кровотока (посев крови). Методическое пособие для врачей.* М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; 2015.
- Попов Д.А., Овсенко С.Т., Вострикова Т.Ю. Экспресс-идентификация положительных гемокультур с помощью метода прямой MALDI-ToF масс-спектрометрии. *Анестезиология и реаниматология.* 2015; 60(5): 71–5.
- Попов Д.А., Овсенко С.Т., Вострикова Т.Ю. Применение метода MALDI-ToF MS в современной микробиологической лаборатории. *Поликлиника.* 2016; (3): 1–4.
- Ломинадзе Г.Г., Семенова Е.А., Мотузова О.В., Калакуцкая А.Н., Балабанов А.С., Лазарева А.В. и др. Применение MALDI-ToF масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов в гемокультурах пациентов с подозрением на сепсис. *Вопросы диагностики в педиатрии.* 2013; (2): 28–32.
- Богомолова Н.С., Кузнецова С.М., Большаков Л.В. Роль микробиологического мониторинга и лекарственного анамнеза в эффективности антибиотикопрофилактики и антибиотикотерапии инфекционных осложнений после реконструктивных оперативных вмешательств. *Анестезиология и реаниматология.* 2015; 60(2): 20–6.

REFERENCES

- Rhodes A., Evans L.E., Alhazzani W., Levy M.M., Antonelli M., Ferrer R., et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock. 2016. *Intensive Care Med.* 2017; 43(3): 304–77.
- Valencia-Shelton F., Loeffelholz M. Nonculture techniques for the detection of bacteremia and fungemia. *Future Microbiol.* 2014; 9(4): 543–59.
- Price C., Douglas I., Tuttle E., Shorr A., Mensack M., Bessesen M., et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of bacteria in bloodstream infections using the Accelerate ID/AST technology. ePoster presented at ECCMID. Copenhagen, Denmark: 2015.
- Patel R. New Developments in Clinical Bacteriology Laboratories. *Mayo Clin Proc.* 2016; 91(10): 1448–59.
- Pfaller M.A., Wolk D.M., Lowery T.J. T2MR and T2Candida: novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis. *Future Microbiol.* 2016; 11(1): 103–17.
- Mancini N., Carletti S., Ghidoli N., Cichero P., Burioni R., Clementi M. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23(1): 235–51.
- Багирова Н.С., Дмитриева Н.В. *Диагностика Bloodstream Infections (Blood Cultures). Guideline for Physicians [Диагностика инфекций кровотока (посев крови). Методическое пособие для врачей].* Moscow: RONTs im. N.N. Blokhina RAMN; 2015. (in Russian)
- Popov D.A., Ovseenko S.T., Vostrikova T.Yu. Express identification of positive blood cultures using direct MALDI-ToF mass spectrometry. *Anesteziology i reanimatologiya.* 2015; 60(5): 71–5. (in Russian)
- Popov D.A., Ovseenko S.T., Vostrikova T.Yu. Using of MALDI-ToF MS in modern laboratory of microbiology. *Poliklinika.* 2016; (3): 1–4. (in Russian)
- CLSI document M47-A. Principles and Procedures for Blood Cultures;

- Approved Guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
11. Lominadze G.G., Semenova E.A., Motuzova O.V., Kalakutskaya A.N., Balabanov A.S., Lazareva A.V., et al. Application of MALDI-ToF mass spectrometry for identification of blood cultures in patients with suspected sepsis. *Voprosy diagnostiki v pediatrii*. 2013; (2): 28–32. (in Russian)
 12. Idelevich E.A., Schüle I., Grünastel B., Wüllenweber J., Peters G., Becker K. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-ToF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(10): 1001–6.
 13. Vardakas K.Z., Anifantaki F.I., Trigkidis K.K., Falagas M.E. Rapid molecular diagnostic tests in patients with bacteremia: evaluation of their impact on decision making and clinical outcomes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2015; 34: 2149–60.
 14. Köck R., Wüllenweber J., Horn D., Lanckohr C., Becker K., Idelevich E.A. Implementation of short incubation MALDI-ToF MS identification from positive blood cultures in routine diagnostics and effects on empiric antimicrobial therapy. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2017; 6: 12.
 15. Bogomolova N.S., Kuznetsova S.M., Bol'shakov L.V. The role of microbiological monitoring and drug history in the effectiveness of antibiotic prophylaxis and antibiotic treatment of infectious complications after reconstructive surgeries. *Anesteziologiya i reanimatologiya*. 2015; 60(2): 20–6. (in Russian)
 16. Idelevich E.A., Schüle I., Grünastel B., Wüllenweber J., Peters G., Becker K. Acceleration of antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures by inoculation of Vitek 2 cards with briefly incubated solid medium cultures. *J. Clin. Microbiol*. 2014; 52(11): 4058–62.

Поступила 10.05.17

Принята к печати 28.08.17

ИНТЕНСИВНАЯ ТЕРАПИЯ В ПЕДИАТРИИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 617-001.17-053.2-07:616.1-008.1

Лекманов А.У.^{1,2}, Азовский Д.К.², Пилютник С.Ф.²

ГЕМОДИНАМИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ У ДЕТЕЙ С ТЯЖЕЛОЙ ОЖОГОВОЙ ТРАВМОЙ В ПЕРВЫЕ ЧАСЫ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ

¹ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва

² ГБУЗ ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского ДЗМ, 123317, Москва

Цель исследования. Определить параметры центральной гемодинамики и транспорта кислорода у детей с тяжёлой ожоговой травмой в первые часы после повреждения.

Материал и методы. В наблюдательное, нерандомизированное, проспективное исследование включены 24 ребёнка в возрасте от 6 месяцев до 13 лет с ожогами тела общей площадью от 10 до 40%. Контрольную группу составили 24 соматически здоровых ребёнка, сходных по возрасту, массе тела, росту, наблюдаемых в отделении интенсивной терапии после плановых оперативных вмешательств. Оценка параметров центральной гемодинамики проводилась методом трансторакальной доплерографии (ТТДГ). Регистрировали сердечный индекс (СИ) в л/мин/м², ударный индекс (УИ) в мл/м², индекс общего периферического сопротивления (ИОПСС) в дин·сек·см⁻⁵/м², с дальнейшим расчётом показателей транспорта кислорода. Целевыми точками для пациентов основной группы: темп диуреза 0,5–2,0 мл/кг/ч, СИ ≥ 3,0 л/мин/м², УИ ≥ 30 мл/м², ИОПСС ≥ 900 дин·сек·см⁻⁵/м². Исходные результаты были получены в течение 30 мин после поступления в стационар с дальнейшей регистрацией каждые 8 ч в течение 24 ч.

Результаты. Показатели гемодинамики и расчётные показатели транспорта кислорода находятся в интервалах, значимо не отличающихся от показателей в контрольной группе ($p \geq 0,05$) и соответствуют физиологическим параметрам. Целевые показатели параметров гемодинамики достигнуты у всех пациентов основной группы в каждый момент времени. Повышения интегральных показателей транспорта кислорода коэффициента и индекса экстракции кислорода, характерных для состояния шока зафиксировано не было.

Заключение. У детей с ожогами на общей площади поверхности тела от 10 до 40% показатели центральной гемодинамики и транспорта кислорода не выходят за пределы физиологических показателей при соблюдении условий доставки в стационар в течение первых двух часов после травмы, обеспечения адекватного обезболивания, проведения минимально достаточной инфузионной терапии и ранней энтеральной нагрузки.

Ключевые слова: ожоги; дети; гемодинамика; мониторинг.

Для цитирования: Лекманов А.У., Азовский Д.К., Пилютник С.Ф. Гемодинамический профиль у детей с тяжёлой ожоговой травмой в первые часы после повреждения. *Анестезиология и реаниматология*. 2017; 62(5): 387–393. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0201-7563-2017-62-5-387-393>

Lekmanov A.U.^{1,2}, Azovsky D.K.², Pilyutik S.F.²

HEMODYNAMIC PROFILE IN CHILDREN WITH SEVERE BURN TRAUMA IN THE FIRST HOURS AFTER INJURY

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russia

² Speransky Children State Clinical Hospital № 9, Moscow, 123317, Russia

The purpose of this observational, non-randomized, prospective study was to evaluate cardiac function in pediatric burn patients within the first hours after injury.

Material and methods. Transthoracic Doppler data including cardiac index, stroke index, systemic vascular resistance index, oxygen delivery and transport data had been collected on 24 burn and 24 non-burn pediatric patients from 2015 to 2016. The Me age of the patients was 1,0 [1;4] years and the Me TBSA burn size was 20% [15;25].

Results. There were no significant differences between burn and non-burn children for systemic hemodynamics and parameters of oxygen transport.