

Попов Д.А., Овсенко С.Т., Вострикова Т.Ю.

ЭКСПРЕСС-ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ГЕМОКУЛЬТУР С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ПРЯМОЙ MALDI-TOF-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

ФГБНУ НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева, 121552, Москва

*Цель исследования. Оценить эффективность прямой идентификации возбудителей бактериемии с помощью прямой матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной (MALDI-TOF) масс-спектрометрии в сравнении с рутинным методом. Материал и методы. В проспективное исследование включено 211 положительных гемокультур, полученных от 116 пациентов (106 взрослых и 10 детей) в возрасте от 2 нед до 77 лет, находящихся в ОРИТ после операций на открытом сердце. Инкубация осуществлялась в аэробных флаконах с сорбентом для антибиотиков с помощью анализатора BacT/ALERT 3D 120 (bioMérieux, Франция). Параллельно с рассевом первичных гемокультур на плотные питательные среды с последующей идентификацией чистых культур с применением MALDI-TOF-масс-спектрометрии на анализаторе Vitek MS, bioMérieux, Франция (рутинный метод), после соответствующей пробоподготовки осуществляли прямое (без предварительного посева) MALDI-TOF-масс-спектрометрическое исследование монокомпонентных гемокультур (n = 201). Результаты. С применением рутинного метода в 211 положительных гемокультурах идентифицировано 23 вида микроорганизмов (стафилококки (n = 87), энтеробактерии (n = 71), энтерококки (n = 20), неферментирующие грамотрицательные бактерии (n = 18), прочие (n = 5)). Среднее время инкубации образцов до получения сигнала о наличии роста гемокультуры составило 16,2±7,4 ч (от 3,75 до 51 ч). В течение первых 12 ч инкубации получен рост 32,4% проб, а в первые сутки – 92,2%. При прямом масс-спектрометрическом анализе монокомпонентных гемокультур (n = 201) корректно определено до вида 153 (76,1%) образца, при этом доля успешных идентификаций грамотрицательных бактерий была выше, чем грамположительных (85,4 и 69,1% соответственно; p = 0,01). Выявлена высокая степень согласованности результатов стандартного и прямого методов идентификации гемокультур с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии (κ = 0,96, p < 0,001; в расчет включены образцы, для которых оба варианта дали результат). Случаи неудачной прямой идентификации гемокультур (n = 48) в большинстве (89,6%) были связаны с невозможностью соотнесения полученного при анализе образца масс-спектра с библиотечным (ответ системы – «нет идентификации»). В остальных 5 случаях выявлено расхождение результатов, при этом в трех пробах отмечено несовпадение вида микроорганизма, не имеющие клинического значения (*S. haemolyticus* (n = 2) и *S. hominis* (n = 1) по данным масс-спектрометрического анализа и *S. epidermidis* в посеве), в двух случаях микроорганизм идентифицирован неправильно (*Mycobacterium kansasii* и *Burkholderia vietnamsis* вместо *S. epidermidis* и *S. hominis* соответственно). Среди включенных в исследование образцов было 10 смешанных культур (ассоциации из двух микроорганизмов), которые также были подвергнуты прямому масс-спектрометрическому анализу. При этом в 7 (70%) случаях был определен до вида один микроорганизм из ассоциации, в 2 случаях имела место корректная идентификация одного из микроорганизмов до рода, еще в одной пробе результат не получен. Временные затраты на проведение прямого масс-спектрометрического анализа, включая пробоподготовку, составляли не более 1 ч. Вывод. Метод прямой MALDI-TOF-масс-спектрометрии позволяет значительно ускорить идентификацию гемокультур, что может способствовать максимально раннему назначению эффективных режимов стартовой антибиотикотерапии.*

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

Для цитирования: Анестезиология и реаниматология. 2015; 60 (5): 71-75.

EXPRESS IDENTIFICATION OF POSITIVE BLOOD CULTURES USING DIRECT MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY

Popov D.A., Ovseenko S.T., Vostrikova T.Yu.

Bakoulev Scientific Centre for Cardiovascular Surgery, Moscow, 121552, Russian Federation

Objective: To evaluate the effectiveness of direct identification of pathogens of bacteremia by direct matrix assisted laser desorption ionization time-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) compared to routine method. Material and Methods: A prospective study included 211 positive blood cultures obtained from 116 patients (106 adults and 10 children) aged from 2 weeks to 77 years old in the ICU after open heart surgery. Incubation was carried out under aerobic vials with a sorbent for antibiotics Analyzer BacT / ALERT 3D 120 (bioMérieux, France). In parallel with the primary sieving blood cultures on solid nutrient media with subsequent identification of pure cultures using MALDI-TOF mass spectrometry analyzer Vitek MS, bioMérieux, France (routine method), after appropriate sample preparation we carried out a direct (without screening) MALDI-TOF mass spectrometric study of monocomponental blood cultures (n = 201). Results: using a routine method in 211 positive blood cultures we identified 23 types of microorganisms (Staphylococcus (n = 87), Enterobacteriaceae (n = 71), Enterococci (n = 20), non-fermentative Gram-negative bacteria (n = 18), others (n = 5). The average time of incubation of samples to obtain a signal of a blood culture growth was 16.2 ± 7.4 h (from 3.75 to 51 hours.) During the first 12 hours of incubation, growth was obtained in 32.4% of the samples, and on the first day in 92.2%. In the direct mass spectrometric analysis monocomponental blood cultures (n = 201) is well defined up to 153 species of the sample (76.1%), while the share of successful identification of Gram-negative bacteria was higher than that of Gram-positive (85.4 and 69.1%, respectively, p = 0.01). The high degree of consistency in the results of standard and direct method of identifying blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry (κ = 0.96, p < 0.001; the samples included in the calculation, for which both option given result). Duration of the direct mass spectrometric analysis, including sample preparation, was no longer than 1 hour. Conclusion: The method of direct MALDI-TOF mass spectrometry allows to significantly speed up the identification of blood cultures that may contribute as much as possible early appointment effective regimes of starting antibiotic therapy.

Key words: bacteremia, infectious complications, MALDI-TOF mass spectrometry.

Citation: Anesteziologya i reanimatologiya. 2015; 60 (5): 71-75. (in Russ.)

Введение. Нозокомиальные инфекции являются крайне актуальной проблемой современной медицины, значимо ухудшая результаты лечения и негативно влияя на показатели летальности. В настоящее время доказано, что успех лечения тяжелых инфекций напрямую зависит от максимально раннего назначения адекватного антимикробного препарата [1, 2], поэтому значение их ранней диагностики трудно переоценить.

Одним из осложнений при тяжелом течении ряда инфекций, а также их ведущим симптомом (например, при инфекционном эндокардите, инфекциях кровотока) является бактериемия – циркуляция живых бактерий в кровяном русле. По данным двухэтапного однодневного многоцентрового российского исследования РИ-ОРИТ (распространенность инфекций в отделениях реанимации и интенсивной терапии), в котором проанализированы результаты, полученные от 250 пациентов, находившихся в 62 ОРИТ, инфекции различной локализации имелись у 34,1% больных, причем частота бактериемии достигала 9,1% [3]. Бактериемия, развивающаяся в ОРИТ, сопровождается приростом показателя летальности в среднем на 11% [4]. Ранняя идентификация возбудителей бактериемии является определяющим условием для обеспечения максимальной эффективности лечения, предотвращения прогрессирования инфекции с развитием таких жизнеугрожающих состояний, как септический шок и полиорганная недостаточность.

Золотым стандартом диагностики бактериемии, несмотря на существенные временные затраты, требующиеся для получения результата, до сих пор остается культуральный метод – посев крови на жидкую или комбинированную питательную среду. В настоящее время для инкубации гемокультур широко используются автоматические анализаторы, позволяющие сократить время до получения роста пробы, повысить качество и снизить трудоемкость исследования. При этом используются стандартизованные питательные среды с высокими ростовыми свойствами; наличие в среде сорбентов позволяет увеличить вероятность выявления бактериемии у больных, принимающих антибиотики.

После получения первичной гемокультуры (рост во флаконе) обычно проводится ее рассев на плотные питательные среды с последующей фенотипической идентификацией микроорганизма и определением профиля его чувствительности к антимикробным препаратам. Данный этап требует дополнительных 1,5–2 сут для своей реализации, что плохо согласуется с тезисом о необходимости максимально раннего назначения адекватного антибиотика и может приводить к использованию как недостаточно эффективных, так и избыточных режимов терапии.

Одним из достижений последних лет явилась адаптация технологии матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight – MALDI-TOF – mass spectrometry) для идентификации микроорганизмов. Данный метод, основанный на дезинтеграции микробных клеток до белковых фрагментов с последующим сравнением полученного спектра с эталонным (белковое профилирование), позволяет сократить время идентификации микроорганизмов до нескольких минут при достоверности результата, приближающейся к абсолютной. Тем не менее на практике при исследовании гемокультур обычно используется материал, полученный путем их рассева на плотные питательные среды, на что требуется порядка 16–18 ч.

С целью ускорения этиологической диагностики бактериемии предложен ряд методов, позволяющих как ускорить процессинг первичной гемокультуры (различные варианты ПЦР-диагностики, газовая хромато-масс-спектрометрия микробных маркеров), так и вообще исключить культивирование возбудителя (ПЦР-анализ в режиме реального времени с использованием в качестве субстрата цельной крови пациентов) [5–7]. Наряду с несомненными временными преимуществами данные методы характеризуются ограниченным перечнем идентифицируемых патогенов. В связи с тем что ПЦР может быть ингибирована гепарином, существуют ограничения по применению методов на ее основе у больных, получающих данный препарат, рутинно используемый в интенсивной терапии.

Информация для контакта:

Попов Дмитрий Александрович

Correspondence to:

Popov Dmitriy; e-mail: da_popov@inbox.ru

С учетом характеристик первичной гемокультуры (взвесь микробных клеток, клеток крови и детрита в жидкой питательной среде) и возможностей метода MALDI-TOF-масс-спектрометрии интерес представляет попытка прямого анализа данной смеси с целью ускорения получения результата идентификации возбудителя.

Цель – оценить эффективность прямой идентификации возбудителей бактериемии с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии в сравнении с рутинным методом.

Материал и методы. С апреля по декабрь 2014 г. в проспективное исследование включено 211 положительных гемокультур, полученных в сроки от 6 до 258 сут после операции от 116 кардиохирургических пациентов (106 взрослых и 10 детей) в возрасте от 2 нед до 77 лет, с врожденными и приобретенными заболеваниями сердца, находящихся в ОРИТ в связи с осложненным течением послеоперационного периода. Ведущей причиной пролонгированного пребывания в ОРИТ была сердечная и дыхательная недостаточность, требующая продленной респираторной поддержки – суммарно она отмечалась у 35 (30%) из 116 больных. Показаниями к исследованию крови на стерильность были наличие верифицированного очага инфекции или подозрения на него в сочетании с клинико-лабораторными признаками системного воспаления. Работа выполнялась с использованием образцов, направляемых в лабораторию по назначе-

Таблица 1

Результаты прямой идентификации гемокультур методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии (n = 201)

Микроорганизм	Число гемокультур	Успешная прямая идентификация
Энтеробактерии	71	61 (85,9%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	49	44
<i>Enterobacter cloacae</i>	11	8
<i>Serratia marcescens</i>	7	6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1
Неферментирующие грамотрицательные бактерии	18	15 (83,3%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	8
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6	6
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	1
<i>Pseudomonas putida</i>	1	0
Энтерококки	20	15 (75%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	15	12
<i>Enterococcus faecium</i>	4	2
<i>Enterococcus hirae</i>	1	1
Стафилококки	87	60 (69%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	43	23
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	22	17
<i>Staphylococcus hominis</i>	14	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	6
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	1
<i>Staphylococcus equorum</i>	1	0
Грибы	2	1 (50%)
<i>Candida albicans</i>	1	0
<i>Candida parapsilosis</i>	1	1
Прочие	3	1 (33,3%)
<i>Bacillus brevis</i>	1	1
<i>Micrococcus luteus</i>	1	0
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1	0
Всего ...	201	153 (76,1%)

Время инкубации (в ч) до момента детекции роста наиболее часто встречающихся гемокультур

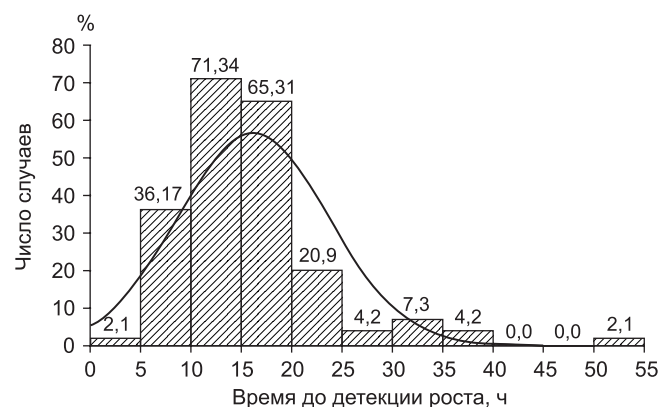
Категория	Число гемокультур	$M \pm SD$	min-max
Коагулазонегативные стафилококки	81	20,3±8,6	6,3–51
Энтеробактерии	71	12,4±4,3*	6,5–23
Неферментирующие грамотрицательные бактерии	18	15,3±2,1**	11,3–17,3
Энтерококки	20	10,8±4,1***	3,8–14,9

Примечание. * – $p < 0,001$; ** – $p = 0,06$; *** – $p = 0,006$.

14,2 ч для *Candida parapsilosis* и 18,9 ч для *Candida albicans*. В целом в течение первых 12 ч инкубации получен рост 32,4% проб, а в первые сутки – 92,2% (см. рисунок). Все выявленные в более поздние сроки гемокультуры (до 51-го часа инкубации) представлены коагулазонегативными стафилококками.

При прямом масс-спектрометрическом анализе 201 монокомпонентной гемокультуры ($n = 201$) корректно определено до вида 153 (76,1%) образца, при этом доля успешных идентификаций грамотрицательных бактерий была выше, чем грамположительных (85,4 и 69,1% соответственно; $p = 0,01$). Данные относительно видов микроорганизмов представлены в табл. 1. Выявлена высокая степень согласованности результатов стандартного и прямого методов идентификации гемокультур с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии ($\kappa = 0,96$, $p < 0,001$; в расчет включены образцы, для которых оба метода дали результат). Полученные данные согласуются с имеющимися в литературе: в исследовании N. Wüppenhorst [8] с применением прямого MALDI-TOF-масс-спектрометрического метода до вида было корректно определено 74,3% гемокультур. Путем варьирования способов пробоподготовки с целью обогащения исходного субстрата и улучшения качества его очистки можно достичь еще более высокого процента успешных идентификаций. Так, J. Mestas и соавт. [9] при исследовании 159 монокомпонентных гемокультур идентифицировали до вида 80,4% образцов, при этом также было отмечено, что грамотрицательные микроорганизмы поддаются идентификации лучше по сравнению с грамположительными (90,3 и 78,4% соответственно). J. Monterio и соавт. [10] продемонстрировали возможность видовой идентификации 97 (99%) из 98 грамотрицательных и 121 (82,3%) из 147 грамположительных гемокультур.

Случаи неудачной прямой идентификации 48 гемокультур MALDI-TOF-масс-спектрометрическим методом в своем большинстве (89,6%) были связаны с невозможностью соотнесения полученного при анализе образца масс-спектра с библиотечным с помощью штатного программного обеспечения прибора, работающего в автоматическом режиме и не предполагающего вмешательства оператора (ответ системы – «нет идентификации»). В остальных 5 выявлено расхождение результатов, при этом в 3 пробах отмечено несовпадение вида микроорганизма, не имеющее клинического значения (*S. haemolyticus* ($n = 2$)).



Частота положительных результатов в зависимости от времени инкубации ($n = 211$).

нию лечащего врача, и не предполагала дополнительных интервенционных вмешательств.

Посев крови проводился с использованием специальных флаконов, содержащих обогащенную питательную среду и сорбент для антибиотиков (активный уголь или полимерные гранулы), при помощи инкубатора VacT/ALERT 3D 120 (bioMérieux, Франция). Образцы крови, взятые в асептических условиях путем пункции периферической вены, инокулировали во флакон, который помещали в термостатируемый шейкер инкубатора при температуре 37°C. Далее в автоматическом режиме происходило оптическое считывание состояния индикатора роста, находящегося в области дна флакона и реагирующего изменением окраски на нарастание концентрации углекислого газа, синтезируемого микроорганизмами в процессе своего роста. При изменении цвета индикатора инкубатор подавал сигнал, по получении которого проводилось извлечение флакона с окраской по Граму и микроскопическим исследованием его содержимого, последовательным высевом гемокультуры на плотные питательные среды, идентификацией микроорганизмов с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии (анализатор Vitek MS, bioMérieux, Франция) и определением ее чувствительности к антимикробным препаратам на автоматическом микробиологическом анализаторе Vitek-2 compact (bioMérieux, Франция). Информация о положительных гемокультурах, а также результаты идентификации и определения чувствительности микроорганизмов автоматическим способом передавались в специальную программу, позволяющую отслеживать этапы исследования образца в режиме реального времени и получать результаты в виде активных уведомлений.

Параллельно с описанным выше рутинным методом проводили прямую идентификацию первичных монокомпонентных гемокультур с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии. При этом для подготовки к анализу образца из флаконов, содержащих в качестве сорбента полимерные гранулы, к 1 мл его содержимого, помещенного в микропробирку, добавляли 200 мкл 5% водного раствора сапонина для лизиса эритроцитов. Смесь инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, лизат центрифугировали (12 000 об/мин, 1 мин), после чего удаляли супернатант. Далее осадок промывали 1 мл фосфатно-солевого буфера, затем повторно центрифугировали (12 000 об/мин, 1 мин) и удаляли супернатант. К осадку добавляли сначала 300 мкл бидистиллированной воды, перемешивали, затем 900 мкл этанола, центрифугировали (12 000 об/мин, 2 мин), удаляли супернатант, осадок подсушивали при комнатной температуре в течение нескольких минут, после чего к нему последовательно добавляли сначала 20 мкл муравьиной кислоты, затем равное количество ацетонитрила. Полученную суспензию перемешивали, после чего центрифугировали (12 000 об/мин, 2 мин), 1 мкл белкового экстракта наносили на мишень масс-спектрометра в двух повторностях, подсушивали, после чего добавляли раствор матрикса (α -циано-4-гидроксикоричная кислота) в соотношении 1:1 и оставляли до полного высыхания.

Пробоподготовка образца из флаконов, содержащих в качестве сорбента активный уголь, включала предварительный этап его осаждения путем центрифугирования (400 об/мин, 0,5 мин), не приводящего к седиментации микроорганизмов.

Масс-спектры регистрировали в автоматическом режиме в диапазоне 2–20 кД. Исследуемые образцы помещали в вакуумную камеру прибора, где они под воздействием лазерного излучения подвергались мягкой ионизации. Образующиеся при этом заряженные частицы двигались в электрическом поле к аноду-детектору со скоростью, пропорциональной их массе, формируя соответствующий масс-спектр. При сканировании каждого образца снимали по 100 спектров. Идентификацию микроорганизмов осуществляли путем автоматического сравнения полученных масс-спектров с референсной базой данных, содержащей информацию более чем о 950 клинически значимых видах микроорганизмов.

Данные представлены как среднее значение с указанием среднеквадратического отклонения. Для оценки наличия статистически значимых различий между группами использован t -тест Стьюдента. Оценка согласованности результатов идентификации возбудителей бактериемии стандартным и прямым методами проведена с помощью индекса каппа. Значения $p < 0,05$ приняты статистически значимыми.

Результаты исследования и их обсуждение. С применением рутинного метода в 211 положительных гемокультурах идентифицировано 23 вида микроорганизмов (табл. 1). Среднее время инкубации образцов до получения сигнала о наличии роста гемокультуры составило $16,2 \pm 7,4$ ч (от 3,75 до 51 ч) и статистически значимо не различалось между энтеробактериями, не ферментирующими грамотрицательными бактериями и энтерококками. Для детекции роста коагулазонегативных стафилококков требовалось значимо больше времени (табл. 2). Время получения роста культуры грибов рода *Candida* составило

Таблица 3

Результат сравнительного анализа микробных ассоциаций (n = 10)

Рутинный метод	Прямая идентификация
<i>A. baumannii</i> + <i>S. haemolyticus</i>	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> + <i>S. epidermidis</i>	<i>A. baumannii</i>
<i>S. marcescens</i> + <i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
<i>E. faecium</i> + <i>S. haemolyticus</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. faecium</i>	Нет идентификации
<i>K. pneumoniae</i> + <i>S. marcescens</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>
<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>S. epidermidis</i> + <i>E. faecium</i>	<i>S. haemolyticus</i>

и *S. hominis* (n = 1) по данным масс-спектрометрического анализа и *S. epidermidis* (в посевах), в 2 случаях микроорганизм идентифицирован неправильно (*Mycobacterium kansasii* и *Burkholderia vietnamsis* вместо *S. epidermidis* и *S. hominis* соответственно). Таким образом, «критическая» ошибка была лишь в 2 (1%) из 201 случая, что ниже показателя, приводимого рядом других авторов (в упомянутой выше работе N. Würpenhorst и соавт. – 2,4%) [8].

Доля успешно определенных до вида гемокультур с применением описанных способов пробоподготовки образцов в нашем исследовании была выше при использовании угольсодержащих флаконов (46 (86,8%) из 53 по сравнению с 107 (72,3%) из 148 флаконов с полимерными гранулами; $p = 0,04$). Вероятной причиной при этом может являться более высокая доля грамотрицательных гемокультур во флаконах, в которых в качестве сорбента применялся активированный уголь (34 (64,2%) из 53 против 55 (37,2%) из 148 соответственно; $p = 0,001$). Оба вида флаконов использовали параллельно в случайном порядке.

Программное обеспечение MALDI-TOF-масс-спектрометра, использованного в настоящей работе, предназначено для идентификации чистых культур микроорганизмов. Среди включенных в исследование образцов было 10 смешанных культур (ассоциации из двух микроорганизмов), которые также были подвергнуты масс-спектрометрическому анализу. При этом в 7 (70%) случаях был определен до вида один микроорганизм из ассоциации, в 2 случаях имела место корректная идентификация одного из микроорганизмов до рода, еще в одной пробе результат не получен (табл. 3). Таким образом, идентификация смешанных культур относится к ограничениям данного метода.

Временные затраты на проведение прямого масс-спектрометрического анализа гемокультур, включая пробоподготовку, составляют не более 1 ч, что при условии проведения локального микробиологического мониторинга может способствовать существенно повышению эффективности стартовой антибиотикотерапии. Для сравнения – получение и идентификация чистых культур с плотных питательных сред методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии обычно занимают 16–18 ч, а с применением наиболее часто используемых на практике фенотипических методов – до 1–2 сут. Необходимо отметить, что наряду с идентификацией необходимо оценивать чувствительность гемокультур к антибиотикам, что в настоящее время в полноценном виде возможно только с применением традиционных подходов (метод серийных разведений и его модификации, метод Kirby–Bauer, E-тесты). Существуют экспериментальные разработки на основе физико-химического анализа методом MALDI-TOF-продуктов, образующихся при инкубации исследуемого микроорганизма в растворе того или иного антимикробного препарата, позволяющие оценить активность того или иного антимикробного препарата [11]. Следует также отметить разработки по исследованию первичных гемокультур с помощью стандартных микробиологических анализаторов, минуя стадию получения чистых культур на плотных питательных средах. Наилучшие результаты при этом дает совместное использование метода MALDI-TOF-масс-спектрометрии для прямой идентификации гемокультур, дополненное прямым определением чувствитель-

ности к антимикробным препаратам путем тестирования фильтра первичной гемокультуры, что позволяет достичь уровня корректной идентификации в 94% случаев, а определения антибиотикограммы в 93,5% со средним временем получения окончательного результата 11,4 ч по сравнению с 56,3 ч при использовании стандартного культурального метода ($p < 0,001$) [12].

В нашем исследовании мы не касались вопроса определения клинической значимости результатов гемокультуривирования, которая зависит от ряда факторов, наиболее важными из которых являются корректность формирования показаний к исследованию, а также правильность техники взятия пробы крови. Наибольшие трудности при интерпретации результата обычно возникают при выделении коагулазонегативных стафилококков, которые могут выступать как в качестве возбудителей инфекций кровотока, так и контаминировать исследуемый образец на преданалитическом этапе. Существенную пользу при этом наряду с анализом клинических данных может дать использование биомаркеров бактериальной инфекции, в частности прокальцитонина [6].

Сбор данных, поступающих с автоматического инкубатора гемокультур, микробиологического анализатора и MALDI-TOF-масс-спектрометра с помощью единой программной среды на основе веб-интерфейса позволяет объединить потоки информации об исследуемых образцах и ускорить получение клинически важной информации, в том числе в режиме удаленного доступа. Данный подход в настоящее время можно считать оптимальным.

Клинический пример

Больная Ф., 67 лет, поступила переводом из другого стационара, в котором находилась по поводу активного инфекционного эндокардита, двусторонней плевропневмонии. Эмпирически проводилась антибактериальная терапия ванкомицином. На этом фоне отмечалась некоторая положительная динамика, однако в связи с разрушением клапанного аппарата сердца и наличием массивных вегетаций 31.10.14 выполнено протезирование митрального и аортального клапанов механическими протезами, дополненное аортокоронарным шунтированием правой коронарной артерии. Время искусственного кровообращения составило 292 мин, время пережатия аорты – 187 мин.

В раннем послеоперационном периоде у больной отмечалась выраженная сердечная и дыхательная недостаточность, что потребовало проведения респираторной поддержки в течение 12 сут. На следующий день после экстубации зарегистрирована отрицательная динамика в виде нарастания признаков интоксикации, отмечен эпизод лихорадки с повышением температуры тела до 38,3°C и падением гемодинамики, повышением уровня прокальцитонина до 22,61 нг/мл (норма до 0,25), что свидетельствовало в пользу тяжелого инфекционного процесса. Рентгенологически – появление свежих инфильтративных изменений в нижней доле левого легкого. Отделяемое нижних дыхательных путей для микробиологического исследования получить не удалось. Эмпирически был назначен меропенем, на фоне лихорадки выполнен посев крови, в котором через 7 ч инкубации выявлен рост грамотрицательных палочек. Параллельно с рассевом первичной гемокультуры на плотные питательные среды в течение 1 ч методом прямой MALDI-TOF-масс-спектрометрии в крови идентифицирован рост *Acinetobacter baumannii*. В соответствии с актуальными данными по локальной чувствительности нозокомиальной флоры (активность карбапенемов в отношении *Acinetobacter baumannii* не превышает 21%, цефоперазона/сульбактама – 26%, активность полимиксина 100%) по поводу ИВЛ-ассоциированной пневмонии, бактериемии больной в тот же день была назначена терапия полимиксином В внутривенно в комбинации с колистином ингаляционно, меропенем отменен. В связи с высоким риском нефротоксичности ванкомицин, назначенный по поводу активного инфекционного эндокардита, заменен на даптомицин. Результат рутинной идентификации гемокультур (*Acinetobacter baumannii*, устойчивый к карбапенемам, чувствительный к полимиксину) получен только на следующий день. На фоне проводимой терапии отмечалась положительная динамика, полимиксин В и колистин отменены через 14 сут лечения. Больная переведена в реабилитационное отделение для окончания курса терапии активного инфекционного эндокардита.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют, что с помощью метода MALDI-TOF-масс-спектрометрии имеется возможность значимого ускорения идентификации гемокультур, что является чрезвычайно важным для оптимизации эмпирического назначения антибиотиков.

Наряду с внедрением новых экспресс-методов дополнительно повысить эффективность микробиологической диагностики возможно путем внедрения лабораторной информационной системы с удаленным доступом, что позволяет врачу-бактериологу по необходимости получать и передавать клиницистам требуемую для лечения больных информацию, не ограничиваясь рамками рабочего времени.

REFERENCES. * ЛИТЕРАТУРА

1. Kumar A., Ellis P., Arabi Y., Roberts D., Light B., Parrillo J. et al. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. Cooperative Antimicrobial Therapy of Septic Shock Database Research Group. *Chest*. 2009; 136 (5): 1237–48.
2. Dellinger R., Levy M., Rhodes A., Annane D., Gerlach H., Opal S. et al. Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric Subgroup. *Intensive Care Med*. 2013; 39 (2): 165–228.
3. Rudnov V.A., Bel'skiy D.V., Dekhnich A.V. The RIORITa Study Group. Infections in Russian ICUs: Results of the Nationwide Multicenter Study. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2011; 4: 294–303. (in Russian)
4. Thompson D.S. Estimates of the rate of acquisition of bacteraemia and associated excess mortality in a general intensive care unit: a 10 year study. *J. Hosp. Infect.* 2008; 69 (1): 56–61.
5. Tissari P., Zumla A., Tarkka E., Mero S., Savolainen L., Vaara M. et al. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *Lancet*. 2010; 375 (9710): 224–30.
6. Popov D.A., Vostrikova T.Yu. The first experience of using the PCR method in real-time to diagnose bacteremia in the postoperative period of cardiac surgery patients. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2011; 8: 49–52. (in Russian)
7. Popov D.A., Ovseenko S.T., Vostrikova T.Yu. Rapid method for identifying pathogens bacteremia using the method of gas chromatography-mass spectrometry. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 5: 54–8. (in Russian)
8. Wüppenhorst N., Consoir C., Lörch D., Schneider C. Direct identification of bacteria from charcoal-containing blood culture bottles using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 31 (10): 2843–50.
9. Mestas J., Felsenstein S., Bard J.D. Direct identification of bacteria from positive BacT/ALERT blood culture bottles using matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 80 (3): 193–6.
10. Monteiro J., Inoue F.M., Lobo A.P., Sugawara E.K., Boaretti F.M., Tufik S. Fast and reliable bacterial identification direct from positive blood culture using a new TFA sample preparation protocol and the Vitek MS system. *J. Microbiol. Meth.* 2015; 109: 157–9.
11. Kostrzewa M., Sparbier K., Maier T., Schubert S. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteom. Clin. Appl.* 2013; 7 (11–12): 767–78.
12. Machen A., Drake T., Wang Y. Same Day Identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from Positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF VITEK mass spectrometry and the VITEK2 system. *PLoS One*. 2014; 9 (2): e87870.

* * *

- *3. Руднов В.А., Бельский Д.В., Дехнич А.В. Исследовательская группа РИОРИТа. Инфекции в ОРИТ России: результаты национального многоцентрового исследования. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2011; 4: 294–303.
- *6. Попов Д.А., Вострикова Т.Ю. Первый опыт применения метода ПЦР в режиме реального времени для диагностики бактериемии в послеоперационном периоде у кардиохирургических больных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 8: 49–52.
- *7. Попов Д.А., Овseenko С.Т., Вострикова Т.Ю. Ускоренный способ идентификации возбудителей бактериемий с применением метода газовой хромато-масс-спектрометрии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 5: 54–8.

Received. Поступила 28.04.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.94-02:616.12-089]-085.382.015.2:615.246.2

Ярустовский М. Б., Абрамян М. В., Кротенко Н.П., Попов Д.А., Плющ М.Г., Гордеев С.Л., Рогольская Е.А.

НОВАЯ КОНЦЕПЦИЯ СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ГЕМОКОРРЕКЦИИ В КОМПЛЕКСНОЙ ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ ТЯЖЕЛОГО СЕПСИСА У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИХ ОПЕРАЦИЙ

ФГБНУ Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева, 121552, Москва, Рублевское шоссе, д. 135

Цель исследования – клиническая и лабораторная оценка безопасности и эффективности совместного использования в едином контуре методик селективной ЛПС-адсорбции с применением картриджей с иммобилизованным на волокнах полимиксином В и процедуры комбинированной плазмифльтрации и адсорбции (CPFA) у больных тяжелым сепсисом после операций на сердце и сосудах. Материал и методы. Обследовано 40 взрослых пациентов с тяжелым сепсисом после кардиохирургических операций. В 1-ю группу вошли 20 пациентов, которым в комплексе интенсивной терапии были выполнены по 2 сочетанные процедуры селективной ЛПС-адсорбции и CPFA в едином контуре. Контрольную группу (2-ю) составили 20 пациентов, которым проводили стандартную комплексную интенсивную терапию сепсиса. Критериями включения были клинические и лабораторные показатели сепсиса (уровень активности эндотоксина ЕАА выше 0,6; прокальцитонин более 2 нг/мл). Результаты. У пациентов 1-й группы мы диагностировали увеличение среднего АД на 12% ($p = 0,001$), индекса оксигенации на 36% ($p = 0,004$), уменьшение лейкоцитоза ($p = 0,01$) и значительное снижение температуры тела ($p = 0,0001$). Также зарегистрировано снижение показателей активности эндотоксина ЕАА на 35% ($p = 0,0003$), уровня прокальцитонина на 55% ($p = 0,005$). В контрольной группе были обнаружены достоверные изменения уровня лейкоцитов, прокальцитонина и температуры. 28-Дневная выживаемость составила 65 и 35% в 1-й и 2-й группах соответственно ($p = 0,11$). Вывод. Совместное использование ЛПС-адсорбции и CPFA в едином экстракорпоральном контуре в составе комплексной интенсивной терапии является безопасным и эффективным методом лечения тяжелого сепсиса.

Ключевые слова: тяжелый сепсис; эндотоксин; селективная ЛПС-адсорбция; селективная гемоперфузия; полимиксином-В (PMX); CPFA; кардиохирургия.

Для цитирования: Анестезиология и реаниматология. 2015; 60 (5): 75-80.

THE NEW CONCEPT OF COMBINED USE OF EXTRACORPOREAL BLOOD CORRECTION IN COMPLEX INTENSIVE THERAPY OF SEVERE SEPSIS IN PATIENTS AFTER CARDIAC SURGERY

Yarustovsky M.B., Abramyan M.V., Krotenko N.P., Popov D.A., Plyusch M.G., Gordeev S.L., Rogalskaya E.A.

Bakoulev Research Center for Cardiovascular Surgery, 121552, Moscow, Russian Federation

Objective: Clinical and laboratory evaluation of the safety and efficacy of combined application of LPS selective adsorption (using cartridges with immobilized polymyxin B on fibers) and plasma filtration and adsorption (CPFA)