

Бактериологический посев мочи за 4 часа с применением метода лазерного светорассеяния: сравнение с традиционным посевом на чашки Петри

Н.М. Колясникова, к.м.н., научный сотрудник, врач КЛД, ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.В. Тиванова, врач высшей категории, врач-бактериолог, ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора

О.Ю. Тимошина, лаборант-исследователь, ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора
С.В. Матосова, младший научный сотрудник, ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора

Д.С. Станкевич, к.б.н., ведущий специалист по продукции ООО «Алифакс»

Инфекции мочевыводящих путей являются одними из наиболее часто встречающихся в медицинской практике. Стандартным методом лабораторной диагностики инфекций мочевыводящих путей является бактериологический посев на плотную питательную среду. В настоящем исследовании мы апробировали автоматический анализатор HB&L (Alifax) для бактериологического скрининга мочи, который обеспечивает быстрое получение легко прослеживаемых результатов. Было проанализировано 278 образцов мочи от амбулаторных и стационарных больных с подозрением на инфекции мочевыводящих путей с помощью традиционного бактериологического посева, системы скрининга Uro-Quick (HB&L), а также дополнительно методами количественной ПЦР и «сухой химии». Из 278 протестированных образцов 126 дали отрицательный результат, в 119 пробах был обнаружен рост микроорганизмов. Для 33 образцов были получены дискордантные результаты при сравнении двух бактериологических методов. Исходя из полученных результатов чувствительность метода Uro-Quick (HB&L) относительно традиционного посева, как референсного метода исследования, составила 91%, а специфичность – 99%. Автоматизированная технология бактериологического исследования мочи позволяет дифференцировать положительные и отрицательные пробы в течение 3–4 часов, при этом отсеять отрицательные пробы можно непосредственно в день получения образца. Дополнительно, постановка теста на остаточную антимикробную активность помогает корректно интерпретировать результаты посева и избежать ложно отрицательных результатов при отсутствии информации о приеме антибиотиков.

Ключевые слова: инфекции мочевыводящих путей, бактериологический посев мочи, бактериурия, чашки Петри, Uro-Quick, HB&L Alifax, остаточная антимикробная активность.

BACTERIOLOGICAL URINE CULTURE FOR 4 HOURS USING THE METHOD OF LASER LIGHT SCATTERING: A COMPARISON WITH TRADITIONAL SOWING ON PETRI DISHES

Kolyasnikova N.M., PhD, Tivanova E.V., Timoshina O.Yu., Matosova S.V. Federal Budget Institution of Science «Central Research Institute of Epidemiology» of the Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, Moscow

Stankevich D.S., PhD, Senior product specialist, Alifax LLS, Moscow

Abstract: The urinary tract infections are one of the most common diseases in medical practice and are diagnosed with traditional streaking on Petri dishes. In the present study, we tested the automatic analyzer HB&L (Alifax) for urine culture screening that provides quickly and easily trace results. Urine samples from outpatients and inpatients (N=278) with suspected urinary tract infection were analyzed by culture on Petri dishes, Uro-Quick (HB&L) urine culture screening method, PCR and urine test strips. Of the 278 samples 126 were negative, in 119 samples the microorganisms growth was detected. For 33 samples discordant results of two methods were obtained. Sensitivity of the Uro-Quick (HB&L) method relatively to traditional cultures on Petri dishes used as the reference method, was 91% and specificity – 99%. Our results show that automated technology of urine bacteriology analyses allows to differentiate positive and negative samples within 3-4 hours and to screen out negative samples on the day of receipt of the sample. Additionally, the residual antimicrobial activity test helps to interpret results correctly and to avoid false-negative results in the absence of information on the antibiotics consumption.

Key words: urinary tract infection, bacteriological urine culture, bacteriuria, Petri dishes, Uro-Quick, HB&L Alifax, residual antimicrobial activity.

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) относятся к наиболее распространенным бактериальным инфекциям во всем мире и имеют огромное клиническое значение как в связи с распространенностью в повседневной медицинской практике, так и в силу возможных осложнений, которые они за собой влекут. Распространенность различных ИМП зависит от возраста, пола и дополнительных предрасполагающих факторов. Особенно подвержены ИМП женщины. Так, по крайней мере, каждая пятая женщина переносит ту или иную клиническую форму ИМП на протяжении жизни [3]. Заболеваемость ИМП возрастает на фоне диабета, анатомических дефектов мочевыводящих путей, а также с возрастом. Около 10% мужчин и 20% женщин в возрасте старше 65 лет имеют значимую бактериурию. Около 5% женщин и 1–2% мужчин также переносят ИМП в детстве [4]. ИМП являются наиболее распространенными нозокомиальными инфекциями, чаще всего обусловленными инвазивными диагностическими процедурами и использованием уретральных катетеров. Важную медицинскую проблему представляют ИМП у беременных женщин, поскольку развитие пиелонефрита может приводить к тяжелым осложнениям беременности, повышению риска преждевременных родов и рождению детей с низкой массой тела [6].

Стандартным методом выявления бактериурии при диагностике ИМП является бактериологический посев мочи, который считается «золотым стандартом». Однако данный метод имеет определенные недостатки, к которым относятся длительность исследования и получения результата (до 48 часов и более), возможные ошибки персонала, качество посева, качество питательных сред, недостаточный уровень стандартизации методик посева и используемых сред, неопределенное количество пересевов, субъективные ошибки при визуальной оценке титра бактерий разными специалистами, трудности при отслеживании результатов отдельных образцов, вероятность ложноположительных результатов, связанных с ростом контаминирующей мочу микрофлоры.

Внедрение в лабораторную практику быстрого и надежного метода скрининга мочи на наличие бактериурии может значительно повысить эффективность лабораторных исследований и минимизировать влияние на результаты вышеуказанных недостатков традиционных ручных методик.

В связи с этим целью нашего исследования стала оценка возможности использования полуавтоматической количественной системы скрининга *Uro-Quick* (HB&L UROQUATTRO производства Alifax, Италия) для получения быстрых и одновременно точных результатов посева мочи в сравнении с традиционными методами посева.

Материалы и методы

Было проанализировано 278 образцов мочи от амбулаторных и стационарных больных с подозрением на инфекции мочевыводящих путей с помощью традиционного бактериологического посева на чашки Петри и системы скрининга *Uro-Quick* с последующим сравнением полученных результатов.



Рис. 1. Анализатор HB&L UROQUATTRO

Исследованию подлежала средняя порция свободно выпущенной мочи, взятой в количестве не менее 25 мл в стерильный контейнер без консерванта. Нативная моча до начала анализа хранилась не более 2 часов при комнатной температуре, в случае необходимости более длительного хранения – при +2–80С, но не более 24 часов.

1. Традиционный посев.

Посев нативной мочи производился на чашки Петри с питательными средами стандартно используемыми в бактериологической лаборатории (кровяной агар, уриселект) бактериологической петлей емкостью 0,005 мл. Далее чашки инкубировали при 370С в течение 24 часов и более.

2. Система скрининга *Uro-Quick* (HB&L) (см. рисунок 1).

Система скрининга *Uro-Quick* (HB&L) – автоматизированная технология для быстрого скрининга бактериурии путем лазерного светорассеяния. Образцы мочи вносятся в специальные флаконы с питательным бульоном, содержимое которых постоянно перемешивается и инкубируется при 370 °С. Каждые 5 минут инкубации через флакон проходит лазерный луч, который позволяет оценить изменения в рассеивающей способности пробы по мере роста бактериальной культуры. Наличие микроорганизмов вызывает отклонение падающего луча света, которое фиксируется чрезвычайно чувствительными детекторами, расположенными вокруг флаконов под углами 300 и 900 к проходящему лучу. Сигналы обрабатываются программным обеспечением анализатора, которое строит кривые роста и рассчитывает обсемененность пробы в колониеобразующих единицах (КОЕ/мл). Первое считывание пробы принимается за точку отсчета для того, чтобы исключить влияние солей, эритроцитов, лейкоцитов, мертвых бактерий и других клеток на итоговый результат. Таким образом, бактериальный рост, обнаруживаемый прибором, обусловлен исключительно живыми делящимися бактериями. Анализатор позволяет автоматически назначить порог чувствительности согласно заданиям лабораторной информационной системы в соответствии с клиническими показаниями для данного пациента [1, 5]. Параллельно с оценкой бактериальной обсеме-

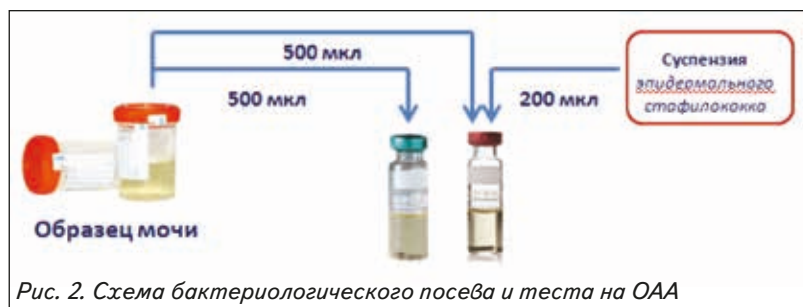


Рис. 2. Схема бактериологического посева и теста на ОАА

ненности анализатор позволяет отслеживать мутность по МакФарланду, что позволяет сразу получать стандартизованную суспензию для последующего анализа на антибиотикочувствительность или идентификацию традиционными методами.

В ходе исследования было использовано пороговое значение микробного числа в 1000 КОЕ/мл. Аликвоту тщательно перемешанной пробы (500 мкл) вручную дозатором вносили во флаконы, содержащие 2 мл питательного бульона. Флаконы устанавливали в считывающий модуль анализатора HB&L и инкубировали в течение 4 часов. Положительные результаты были доступны, начиная с 30 минут от начала анализа в зависимости от патогена и исходной обсемененности пробы.

3. Определение остаточной антимикробной активности (ОАА).

Меню системы *Uro-Quick* включает набор для оценки остаточной антимикробной активности *Uro-Quick R.A.A.* с целью обнаружения антимикробных веществ, которые могут подавлять рост бактерий в клинических пробах, что может быть причиной ложноотрицательных результатов посева на чашки Петри. Флакон из набора для определения ОАА содержит 2 мл бульона и культуру эпидермального стафилококка *Staphylococcus epidermidis*. Рост этой культуры свидетельствует об отсутствии антимикробных веществ в моче, тогда как отсутствие роста указывает на их наличие [2, 5].

Во флаконы набора *Uro-Quick R.A.A.* вносили 200 мкл культуры эпидермального стафилококка, а затем пробу мочи в объеме 500 мкл. Инкубировали в течение 4 часов.

Бактериологический посев и определение ОАА проводились одновременно (см. рисунок 2).

4. Дополнительные методы исследования:

1) ПЦР в режиме реального времени проводили с помощью методики и трех наборов реагентов («ИМП-скрин-FL», «ИМП-Грам(-)-FL», «ИМП-Грам(+)-FL»), разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, позволяющих количественно определять содержание ДНК основных возбудителей ИМП и их идентификацию [7, 8];

2) Метод «сухой химии» для общего анализа мочи (глюкоза, белок, билирубин, уробилиноген, pH, кровь, кетоны, нитриты, лейкоциты, плотность, прозрачность, цвет, аскорбиновая кислота).

Результаты

При сравнении результатов традиционного посева на чашки Петри и системы скрининга *Uro-Quick* (HB&L) с пороговым значением 1000 КОЕ/мл, из 278 протестированных образцов 126 дали отрицательный результат,

в 119 пробах был обнаружен рост микроорганизмов. В 33 образцах были обнаружены дискордантные результаты при сравнении обоих методов: 9 проб были положительны в системе скрининга *Uro-Quick* при отрицательном традиционном посеве, и, напротив, в 24 образцах был обнаружен рост при посеве на чашки Петри, в то время как рост микроорганизмов отсутствовал в системе скрининга *Uro-Quick* (см. таблицу 1).

Таблица 1. Сравнение результатов традиционного посева на чашки Петри и системы скрининга *Uro-Quick*

Посев на чашки Петри	<i>Uro-Quick</i> (HB&L)	Количество образцов	Количество образцов с ОАА +
Отсутствие роста	Отсутствие роста	126	28
Рост	Рост	119	3
Отсутствие роста	Рост	9	0
Рост	Отсутствие роста	24	3

Параллельно с бактериологическим посевом в системе *Uro-Quick* проводилось исследование всех 278 образцов на остаточную антимикробную активность. Как видно из таблицы 1, 34 образца были положительны на ОАА, что составило 12,2% от общего числа исследованных проб, из них в 3 образцах (9%) ОАА была обнаружена при положительном посеве, что может свидетельствовать об отсутствии эффекта от назначенных антимикробных препаратов. Причиной ложноотрицательных результатов (отсутствия роста микроорганизмов) в системе скрининга *Uro-Quick* для 3 из 24 проб положительных при традиционном посеве, по-видимому, являлась обнаруженная в этих пробах ОАА (см. таблицу 1).

Исходя из предварительно полученных результатов, чувствительность метода *Uro-Quick* относительно традиционного посева, как референсного метода исследования, составила 85%, а специфичность – 93%.

Мы провели дополнительный анализ дискордантных образцов, включив в исследование методы ПЦР и «сухой химии» для выявления признаков воспаления в ОАМ. Отрицательный результат при традиционном посеве на чашки Петри и положительных результатах в системе скрининга *Uro-Quick* (9 образцов) не был подтвержден дополнительными методами исследования. Для всех этих проб были получены положительные результаты выявления бактериурии методом ПЦР (содержание ДНК бактерий более 1000 геномных эквивалентов в мл) и в половине из них были обнаружены признаки воспаления (см. таблицы 1, 2). При положительном результате традиционного посева и отрицательном результате посева в системе скрининга *Uro-Quick* (24 образца): в 3 образцах была выявлена ОАА, 8 были отрицательными по результатам ПЦР, и 13 образцов требуют дальнейшего исследования: из них в 10 не было признаков воспаления по результатам ОАМ, в 3 были обнаружены только лейкоциты. Возможными причинами дискордантных результатов по

Таблица 2. Дополнительный анализ дискордантных образцов методами ПЦР и «сухой химии»

Пациент	Посев	Uro-Quick (HB&L) (CFU/ml)	ПЦР	Признаки воспаления в ОАМ («сухая химия»)
1	Отсутствие роста	Рост	+	-
2	Отсутствие роста	Рост	+	-
3	Отсутствие роста	Рост	+	-
4	Отсутствие роста	Рост	+	+
5	Отсутствие роста	Рост	+	+
6	Отсутствие роста	Рост	+	+
7	Отсутствие роста	Рост	+	-
8	Отсутствие роста	Рост	+	+
9	Отсутствие роста	Рост	+	-

данным образцам могут быть: недостаточное время для инкубации в приборе HB&L (Alifax) или возможная контаминация образцов на преаналитическом этапе и как результат – рост микроорганизмов при традиционном посеве на чашках Петри вследствие более длительного времени инкубации (24 часа и более). Лабораторные эксперименты показали, что в отличие от патогенных микроорганизмов контаминирующей флоре нужно 3–4 часа для адаптации (лаг-фаза) в новой среде. Инкубация более 4 часов приведет к ее росту [1]. Система скрининга *Uro-Quick* не определяет контаминирующую флору из-за недостаточного времени инкубации (3–4 часа) для ее роста. Таким образом, исходя из анализа дискордантных результатов, чувствительность метода *Uro-Quick* достигла 91%, а специфичность – 99%.

Обсуждение

Традиционный культуральный метод посева на чашки Петри имеет множество недостатков, которые можно было бы устранить благодаря использованию автоматической системы, оцененной в ходе данного исследования. Автоматизированная технология бактериологического исследования мочи позволяет дифференцировать положительные и отрицательные пробы в течение 3–4 часов, при этом отсеять отрицательные пробы можно непосредственно в день получения образца. Для обеспечения большей клинической достоверности и исключения ложноотрицательных результатов анализатор может параллельно с посевом выполнять тест на остаточную антимикробную активность (ОАА), который позволяет зафиксировать наличие в образце ингибиторов бактериального роста, таких как антибиотики и другие вещества, обладающие антимикробной активностью. Процедура исследования оптимизирована и стандартизована, анализатор

микробиологически чист и безопасен, так как его использование, в сравнении с традиционными методами, значительно снижает риск контакта оператора с патогенами. Все образцы легко прослеживаются благодаря системе распознавания штрих-кодов, а автоматически рассчитываемые кривые роста снижают вероятность ошибки по сравнению с субъективной визуальной интерпретацией результата традиционным методом.

Результаты исследования показали, что система *Uro-Quick* обладает достаточно высокими показателями чувствительности (85%) и специфичности (93%) в сравнении с традиционным посевом на чашки Петри. При изучении причин дискордантных результатов, определенных с использованием дополнительных методов исследования – ПЦР и «сухой химии», чувствительность метода достигла 91%, специфичность – 99%, что коррелирует с результатами, полученными в ходе исследований другими авторами [1, 2]. Таким образом, опыт использования и сравнения результатов четырех методов исследования – *Uro-Quick* (HB&L), посева на чашки Петри, ПЦР и «сухой химии» – не позволяет рассматривать традиционный посев на чашки Петри в качестве метода со 100% чувствительностью и специфичностью (обнаруженная чувствительность – 94%, специфичность – 94%). Преимущество новой методики – быстрота исполнения, что позволяет ускорить принятие клинических решений. Включение теста на ОАА помогает корректно интерпретировать результаты посева и избежать ложноотрицательных результатов при отсутствии клинических данных и информации о приеме антибиотиков. Для правильной интерпретации результатов бактериологического посева мочи мы рекомендуем пробы от всех пациентов проверять на наличие/отсутствие в пробе веществ с антимикробными свойствами.

Литература

1. Ballabio C., Venturi N., Roberta Sala M., Mocarelli P., Brambilla P. Evaluation of an automated method for urine culture screening // *Microbiologia Medica*. 2010. Vol. 25. № 3. P. 178-180.
2. Ilki A., Bekdemir P., Ulger N., Soyletir G. Rapid reporting of urine culture results: impact of the uro-quick screening system // *New microbiologica*. 2010. Vol. 33. № 2. P. 147-153.
3. Ronald A-R., Patrillo A-L-S. The natural history of urinary tract infections in adults // *Med. Clin. North Am.* 1991. Vol. 75. P. 299-312.
4. Viday A., Heffner M.D., Marc H., Gorelick M.D., MSCE. Pediatric urinary tract infection // *Clin. Ped. Emerg. Med.* 2008. Vol. 9. P. 233-237.
5. Гилязова Д.Г. Ускорение бактериологического анализа с помощью технологии Alifax: результат за часы // *Справочник заведующего КДЛ*. 2014. №3. С. 69-73.
6. Никонов А.П., Асцурова О.Р., Капильный В.А. Инфекции мочевыводящих путей и беременность // *Гинекология*. 2007. Том 9, №1. С. 47-49.
7. Савочкина Ю.А., Шипицына Е.В., Гушин А.Е. Разработка методики определения содержания возбудителей инфекций мочевыводящих путей в моче с помощью мультиплексной ПЦР в режиме реального времени // *Молекулярная диагностика* 2014. Том 1. С. 244-245.
8. Хуснутдинова Т.А., Савочкина Ю.А., Шипицына Е.В., Гушин А.Е., Савичева А.М. Применение количественной мультиплексной ПЦР в реальном времени для выявления возбудителей инфекций мочевыводящих путей у беременных женщин // *Педиатр*. 2014. Том V, № 3. С. 37-41.



**ALI
FAX®**

ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В БАКТЕРИОЛОГИИ: ПОЛУЧЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СКРИНИНГА БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ И МОЧИ ЗА НЕСКОЛЬКО ЧАСОВ



Технология лазерного светорассеяния, реализованная в анализаторах компании Алифакс, позволяет за считанные часы получать результаты бактериологического посева, ждать которые при использовании классических методов приходится от 1 суток и более!



- Посев мочи (3 часа, порог 30000 КОЕ/мл)

- Посев биологических жидкостей человека (6 часов, порог <50 КОЕ/мл)

- Тест на остаточную антимикробную активность (наличие антибиотиков в пробе)

- Скрининг микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью (МРЗС, БЛРС/AmpC, Карбапенемазы; 6,5 часов)

- Экспресс-определение чувствительности к антибиотикам (панель подбирается пользователем; 3 часа):

- Уринокультур;
- Положительных проб БЖЧ;
- Положительных гемокультур из флаконов гемокультураторов;
- Изолированных колоний с чашек Петри.

В автоматическом анализаторе **Alfred 60** и полуавтоматическом **HB&L** возможно проведение всего спектра исследований в максимально сжатые сроки — в течение одного дня можно получить достоверные количественные результаты **бактериологического посева, остаточной антимикробной активности и чувствительности к антибиотикам.**



Полуавтоматический анализатор HB&L

Представительство Alifax S.r.l.

125367, г. Москва, ул. Габричевского, д.5. к. 1, тел. +7(495)-540-50-55, info.russia@alifax.com
www.alifax.com