

# Новый быстрый метод прямого тестирования на антимикробную чувствительность бактерий из положительных гемокультур

Симона Барнини<sup>1</sup>, Вероника Брукулери<sup>1</sup>, Паола Моричи<sup>2</sup>, Эмилия Геларди<sup>2</sup>, Уолтер Флорио<sup>2</sup> и Антонелла Лупетти<sup>2</sup> \*

## Аннотация

**Основные этапы:** Своевременная терапия возбудителей инфекций кровотока требует быстрой идентификации и быстрого тестирования на антимикробную чувствительность (AST) к соответствующим антибиотикам. В настоящем исследовании бактерии для идентификации брались из мономикробных культур крови с помощью пробирок для отделения сыворотки, после чего материал переносился на соответствующую плашку для выполнения прямой идентификации микроорганизмов методом времяпролётной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF MS). Для исследования на чувствительность к антибиотикам (AST) были выбраны антибиотики, соответствующие выделенным микроорганизмам. Для получения быстрых результатов анализа на AST бактерии были выделены из положительных гемокультур по двум различным протоколам: с помощью пробирок для отделения сыворотки (далее именуемые ПРОТОКОЛ1), либо после кратковременного пребывания субкультур в жидкой среде (далее именуемые ПРОТОКОЛ2). Полученные результаты сопоставлялись с результатами, полученными обычно применяемыми в настоящий момент в нашей лаборатории методами, как то идентификация при помощи MALDI-TOF и исследование на чувствительность к антибиотикам на аппаратах Vitek 2 или Sensititre в изолированных колониях.

**Результаты:** Прямой метод MALDI-TOF MS распознает 97,5% грамотрицательных бактерий и 96,1% грамположительных кокков в мономикробных гемокультурах. Прямой анализ на AST с помощью протокола ПР1 и ПР2 для всех комбинаций изолята/антимикробного агента совпадал с текущим методом на 87,8% и 90,5% для грамотрицательных бактерий и на 93,1% и 93,8% для грамположительных кокков соответственно. В частности, 100% абсолютное соответствие было обнаружено при исследовании левофлоксацина для энтеробактерий обоими способами ПР1 и ПР2, а также 99% и 100% соответствие наблюдалось в отношении линезолида для грамположительных кокков с помощью ПР1 и ПР2 соответственно. Существенной разницы в точности измерений с использованием протоколов ПР1 и ПР2 для грамотрицательных бактерий и грамположительных кокков не обнаружено.

**Выводы:** Настоящий новый метод представляется перспективным для обеспечения точных результатов анализа на AST. Самое главное, что его результаты будут доступны уже через несколько часов после положительного результата исследования гемокультур, что поможет практикующим врачам быстро подтвердить или скорректировать эффективную антибактериальную терапию у пациентов с инфекциями кровотока.

**Ключевые слова:** Инфекция кровотока, Гемокультура, прямой анализ на AST, Bactec FX, Alfred 60AST, MALDI-TOF.

## Основные этапы:

Быстрая идентификация (БИ) и тестирование на антимикробную чувствительность (AST) к возбудителю (-лям) инфекций кровотока необходимы для своевременного выбора соответствующей антибактериальной терапии, что может привести к улучшению результатов у пациентов [1–4], и способствовать дифференциации возникновения резистентности к антимикробным препаратам [5].

Согласно принятому в настоящее время методу требуется, чтобы положительная гемокультура (ПГ) была пересеяна на твердую среду до проведения идентификации и исследования AST на автоматизированных системах. Для выигрыша во времени были предложены и оценены несколько методов, некоторые из них с обнадеживающими результатами [6–21]. В настоящем исследовании мы стремились разработать метод, чтобы обеспечить быстрые результаты AST, далее именуемый прямой анализ на чувствительность к антибиотикам.

С этой целью мы использовали систему, одобренную CE, Alfred 60AST (Alifax), изначально предложенную для анализа мочи, а также для исследования чувствительности к антибиотикам бактериальных изолятов из мочи [22].

Чтобы адаптировать систему к быстрому анализу на AST из положительных гемокультур, были исследованы два протокола, протокол 1 (ПР1) и протокол 2 (ПР2), первый — с использованием бактерий, выделенных из положительных гемокультур с помощью пробирок для отделения сыворотки; второй — с кратковременным субкультивированием материала из положительной гемокультуры в жидкой среде.

Идентификация бактерий, содержащихся в мономикробной гемокультуре, выполнялась с помощью MALDI-TOF ранее описанным методом, далее именуемым прямой MALDI-TOF метод [11]. Результаты идентификации, полученные методом прямого MALDI-TOF и результаты чувствительности к антибиотикам, полученные с помощью ПР1 и ПР2 были сопоставлены с результатами, полученными с помощью обычно применяемого в нашей лаборатории метода, далее именуемого как обычно принятый метод, т.е. ИД и AST из изолированных колоний с помощью MALDI-TOF и Vitek 2 или Sensititre соответственно.

\*Для корреспонденции:

[antonella.lupetti@med.unipi.it](mailto:antonella.lupetti@med.unipi.it)

2Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in  
Medicina e Chirurgia, Università di Pisa, Пиза, Италия  
Полный перечень информации об авторах доступен в конце  
статьи

© 2016 Автор(ы). Свободный доступ. Настоящая статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons "С указанием авторства" 4.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы предоставите соответствующее разрешение на передачу данных оригинальному автору(ам) и источнику, укажите ссылку на лицензию творческое сообщество Creative Commons, и укажите если были внесены изменения. Отказ от патентных прав в пользу общества Creative Commons (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) применим к данным этой статьи, если не указано иное.

## Методы

### Образцы крови

Образцы крови, поступившие в университетскую больницу Пизы (Италия) в период с июля по декабрь 2014г., были внесены во флаконы для гемокультуривования «Plus Aerobic/F» и «Plus Anaerobic/F» или Peds Plus F (Becton Dickinson & Co, BD, Milan, Italy), собранные в Unità Operativa di Microbiologia, и перемещенные в аппарат Bactec FX (Becton Dickinson, Франклин-Лейкс, Нью-Джерси, США) для мониторинга роста бактерий. От каждого пациента только первые положительные флаконы с гемокультурами и очевидно мономикробные при окрашивании по Граму были включены в это исследование.

### Идентификация и определение чувствительности (AST) бактерий с помощью обычно применяемого метода

Положительная гемокультура была окрашена по Граму на аппарате Bactec FX и пересеяна на соответствующую твердую среду. Изолированные колонии были идентифицированы с помощью MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Бремен, Германия), а анализ на AST был выполнен на аппарате Vitek 2 (Advanced Expert System, версия R04.02C; bioMérieux, Marcy l'Étoile, Франция), либо для изолятов *Acinetobacter baumannii* и *Stenotrophomonas maltophilia* на системе Sensititre Aris (Trek Diagnostic System, Thermo Fisher Scientific, Огайо, США). Результаты идентификации и анализа AST с помощью обычно принятого метода были использованы в качестве сравнения для оценки результатов, полученных с помощью ПР1 и ПР2. Карты для идентификации и для чувствительности к антибиотикам периодически подвергались проверке для оценки контроля качества.

### Идентификация бактерий прямым методом MALDI-TOF

Идентификация бактерий прямым методом MALDI-TOF была выполнена, как описано ранее [11]. MALDI-TOF анализ проводился с применением системы масс-спектрометрии Microflex LT с учетом всех инструкций производителя. Уловленные спектры были проанализированы с использованием MALDI-TOF Biotyper automated control и программного обеспечения Bruker Biotyper 3.1 и библиотеки (4624 изолята) (Bruker Daltonics). Для каждой плашки аппарат был откалиброван с целью проверки достоверности цикла. Результаты идентификации прямым методом MALDI-TOF были сопоставлены с показателями MALDI-TOF, выполненным для изолированных колониях в качестве эталона. Погрешности в идентификации были разрешены с помощью аппарата Vitek 2.

### Прямой анализ бактерий на чувствительность к антибиотикам (AST)

Прямой анализ бактерий на чувствительность был выполнен на аппарате Alfred 60AST (Alifax SpA, Polverara, PD, Италия) и проведен с использованием двух различных протоколов ПР1 и ПР2. Согласно ПР1 бактерии были выделены из положительной гемокультуры с помощью пробирок для отделения сыворотки (BD), как описано ранее [11]. По 8 мл образца каждой положительной гемокультуры переносились в пробирки для отделения сыворотки. Затем бактерии осаждались на поверхности кремниевого слоя вакуумной пробирки центрифугированием 2000 × г в течение 10 мин и суспензированы при 0,9 МакФарланда во флаконах, содержащих 2мл HB&L жидкой среды (Alifax). Полученная бактериальная суспензия вносилась во флакон Alifax со средой, но без антибиотиков, и флакон загружался в охлаждаемую зону, предназначенную для образцов, называемую «Зона внешних образцов» в системе Alfred 60AST. В соответствии с ПР2 20 мкл положительной гемокультуры были инокулированы во флаконы HB&L с 2 мл жидкой среды и загружены в термостат системы Alfred 60AST для мониторинга бактериального роста до 0,5 МакФарланда. Затем аппарат автоматически переносит образец во флакон, свободный от антимикробных препаратов, помещенный в

охлаждаемую зону «Зона для образцов Alfred». Время, необходимое для достижения плотности популяции бактерий, соответствующей 0,5 МакФарланда, равно 1-4 часа, в зависимости от видов бактерий (6ч для *S. Maltophilia*). Лиофилизированные антибиотики (Alifax) растворяли в 2 мл регенерирующего раствора и хранили при 4 °С в течение 6 дней (3 дня для меропенема). Исследуемые антибиотики: левофлоксацин и гентамицин для всех грамотрицательных бактерий, цефотаксим, цефтазидим и меропенем для энтеробактерий, амикацин и колистин для неферментирующих бактерий, линезолид и тейкопланин для всех грамположительных кокков, цефокситин для стафилококков и ампициллин для стрептококков.

Для каждого штамма была составлена панель антибиотиков на основе антибиотиков, доступных на момент начала этого исследования, и из расчета времени, необходимого для проведения анализа. Преимущественно мы выбирали антибиотики, для инкубации которых необходимо три часа вместо пяти. Каждый антибиотик утвержден CE. Выбранные и восстановленные антибиотики во флаконах загружались в соответствующее отделение анализатора Alfred60 AST. Пробирки с 2 мл HB&L жидкой среды, помещали в термостат анализатора Alfred60 AST, где происходило автоматическое внесение бактериальной суспензией (100 мкл) и выбранного антибиотика (200 мкл) для ПР1 и ПР2. Один флакон только с бактериальной суспензией без антибиотиков использовался как положительный контроль роста бактерий.

### **Интерпретация результатов анализа на чувствительность к антибиотикам и анализ данных**

Антимикробная активность тестируемых антибиотиков (в соответствии с ПР1 и РПР) была рассчитана системой в процентах роста бактерий по сравнению с положительным контролем. Процент роста бактерий был автоматически выражен в клинических категориях: рост между 100% и 65% был интерпретирован как устойчивый, между 65% и 50% как промежуточный, и менее <50% как чувствительный (установленные EUCAST контрольные точки [23]). Клинические категории, полученные различными методами, сравнивались с результатами обычно принятого метода и выражены в виде: совпадения, крайне серьезных ошибок (ложно чувствительные), основных ошибках (ложно устойчивые), и незначительные ошибки (чувствительные/устойчивые по отношению к промежуточной чувствительности). Расхождения между результатами прямого анализа на чувствительность к антибиотикам (ПР1 и ПР2) и обычно принятым методом были разрешены при помощи Etest (AB BioMerieux), который был выполнен в соответствии с инструкциями производителя.

Процент крайне серьезных ошибок и основных ошибок был рассчитан в соответствии с действующим стандартом ISO 20776–2. Доля основных ошибок была рассчитана на основе количества испытуемых чувствительных штаммов в качестве мерила.

Статистический анализ проводился с использованием хи-квадрат теста для независимых пар. Уровень значимости был установлен при  $P < 0.05$ .

## **Результаты**

### **Идентификация бактерий из положительных гемокультур прямым методом MALDI-TOF**

В общей сложности 194 положительных гемокультуры были явно мономикробными при окрашивании по Граму, из них одиннадцать (5,7%) в результате оказались полимикробными после пересева, и были исключены из настоящего исследования. Все мономикробные гемокультуры содержали либо грамотрицательные бациллы, либо грамположительные кокки. Восемьдесят мономикробных гемокультур, содержащих грамотрицательные бактерии, и 103, содержащих грамположительные кокки, идентифицировались с помощью прямого метода MALDI-TOF, со средним временем идентификации — 25 минут после получения сигнала о наличии положительной гемокультуры. Параллельно гемокультуры были пересеяны на агаровую питательную среду для микробиологической идентификации по обычно принятому методу.

Идентификация грамотрицательных бактерий прямым методом MALDI-TOF дала удовлетворительный результат для 78 (97,5%) из 80 гемокультур (Таблица 1), 73 (91,3%) из которых составили показатели оценки >2.0. Неопознанные штаммы были корректно идентифицированы с помощью MALDI-TOF на следующий день на изолированных колониях. Двойные исследования совпали на 100% и дали аналогичные результаты идентификации. Ни один штамм не был неправильно определен с помощью метода MALDI-TOF. Идентификация бактерий прямым или обычно принятым методами с применением MALDI-TOF совпадала всегда.

Идентификация грамположительных кокков прямым и обычно принятым методами с применением MALDI-TOF дала совпадающие результаты для 99 (96.1 %) из 103 положительных гемокультур, хотя только 45 (43.7 %) с показателями оценки  $\geq 2.0$  (Таблица 2).

Один *Staphylococcus hominis* был ошибочно идентифицирован по прямому методу как *Staphylococcus haemolyticus*, и один *Streptococcus pneumoniae* как *Streptococcus oralis gr mitis*. Кроме того один штамм *S. hominis* и один штамм *Staphylococcus aureus* не были идентифицированы при помощи прямого метода, но прошли правильную идентификацию при помощи метода MALDI-TOF на изолированных колониях.

### Прямой анализ чувствительности к антибиотикам грамотрицательных бацилл

Результаты чувствительности к антибиотикам по ПР1 и/ или ПР2 были доступны для всех 80 грамотрицательных испытуемых изолятов, 62 из которых оказались энтеробактериями (Таблица 3), и 18 неферментирующими бактериями (Таблица 4). Количество устойчивых, промежуточных и чувствительных штаммов для каждого антибиотика в соответствии с текущим методом кодируется буквами (см. дополнительный файл 1: Таблица S1). В анализе на чувствительность к антибиотикам по ПР1 не удалось выделить 6 изолятов (1 штамм *Enterobacter cloacae*, 2 штамма *P. aeruginosa*, и 3 штамма *A. baumannii*), и по ПР2 также 6 других (1 штамм *K. pneumoniae*, 1 –штамм *Serratia marcescens*, 1 штамм *Acinetobacter ursingii*, 1 штамм *P. aeruginosa*, и 2 штамма *S. maltophilia*).

**Таблица 1:** Грамотрицательные бактерии из мономикробных гемокультур, идентифицированные прямым методом MALDI-TOF

Образцы	Правильно идентифицированные со значением:				Неидентифицированные	Общее число
	3.000–2.300	2.299–2.000	1.999–1.700	<1.700		
<i>Escherichia coli</i>	17	7				24
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	11	1		1	25
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1				2
<i>Enterobacter cloacae</i>		4				4
<i>Morganella morganii</i>	1	1				2
<i>Serratia marcescens</i>		1	1			2
<i>Salmonella spp.</i>		1				1
<i>Proteus mirabilis</i>	1					1
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1					1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	3	2	1	1	12
<i>Acinetobacter baumannii</i>		3				3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		2				2
<i>Acinetobacter ursingii</i>		1				1
Итого	38	35	4	1	2	80

**Таблица 2:** Грамположительные кокки из мономикробных гемокультур, идентифицированные прямым методом MALDI-TOF

Образцы	Правильно идентифицированные со значением:				Неидентифицир.	Неправильно идентифицир.	Общее число
	3.000–2.300	2.299–2.000	1.999–1.700	<1.700			
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		8	21	13			42
<i>Staphylococcus aureus</i>		12	3	1	1		17
<i>Staphylococcus hominis</i>		5	4	2	1	1	13
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	9	1				11
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		4		1			5
<i>Staphylococcus warneri</i>			1	1			2
<i>Staphylococcus</i>			1				1

<i>pettenkoferi</i>							
<i>Staphylococcus sciuri</i>		1					1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>			1				1
<i>Enterococcus faecium</i>	1	2	1				4
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1	1				3
<i>Enterococcus casseliflavus</i>			1				1
<i>Streptococcus sanguinis</i>				1			1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>						1	1
Итого	3	42	35	19	2	2	103

Таким образом исследование антимикробной чувствительности грамотрицательных бацилл (Таблица 3 и 4) вычислялось из 353 (ПР1) и 348 (ПР2) комбинаций изолят/антимикробный препарат. Расхождения между прямым и обычно принятым методом решались с помощью Etest, который показал, по какому протоколу (ПР1 или ПР2) анализ на чувствительность к антибиотикам был верным, для 15 (4.2) и 9 (2.6 %) комбинаций изолят/антимикробный препарат соответственно, все кроме одного, относившегося в энтеробактериям. Полное совпадение результатов чувствительности к антибиотикам (т.е. совпадение результатов для всех тестируемых антибиотиков было выявлено для 35 и (43.7) и 38 (47.5 %) изолятов по ПР1 и ПР2 соответственно. Результаты чувствительности к антибиотикам у грамотрицательных бацилл и общая процентная погрешность, а также процентная погрешность для каждого противомикробного агента отражены в таблицах 3 и 4. Общее количество совпавших результатов чувствительности к антибиотикам у грамотрицательных бактерий было обнаружено у 87,8 и 90,5% всех комбинаций изолят/антимикробный препарат, согласно ПР1 и ПР2 соответственно. Следует отметить, что сходство было выше 90% у цефотаксима, левофлоксацина и амикацина по ПР1, и для левофлоксацина, цефтазидима, амикацина и колистина по ПР2. В целом не было обнаружено существенных расхождений в точности между ПР1 и ПР2 для грамотрицательных бактерий (0,2 <P <0,5).

**Таблица 3:** Анализ на антимикробную чувствительность энтеробактерий из положительных гемокультур по ПР1 (А)<sub>а</sub> и ПР2 (В)<sub>а</sub>

Антимикробный агент	Кол-во крайне серьезных ошибок	Кол-во основных ошибок	Кол-во несуществ. ошибок	Совпадение	Общее значение
А					
Цефотаксим (CTX)	0/40	1/19 (5.3 %)	2/59 (3.4 %)	56 (94.9 %)	59
Цефтазидим (CAZ)	0/32	10/25 (40 %)	4/60 (6.7 %)	46 (76.7 %)	60
Гентамицин (GM)	0/24	10/35 (28.6 %)	2/61 (3.3 %)	49 (80.3 %)	61
Левофлоксацин (LEV)	0/34	0/26 (0 %)	0/60	60 (100 %)	60
Меропенем (MEM)	0/18	5/43 (11.6 %)	2/61 (3.3 %)	54 (88.5 %)	61
Итого (%)	0/148	26/148 (17.6 %)	10/301 (3.3 %)	265 (88.1 %)	301
В					
Цефотаксим (CTX)	6/39 (15.4 %)	0/19	0/58	52 (89.7 %)	58
Цефтазидим (CAZ)	0/31	1/24 (4.2 %)	3/58 (5.2 %)	54 (93.1 %)	58
Гентамицин (GM)	0/25	8/33 (24.2 %)	1/60 (1.7 %)	51 (85 %)	60
Левофлоксацин (LEV)	0/34	0/24	0/58	58 (100 %)	58
Меропенем (MEM)	0/16	6/42 (14.3 %)	2/58 (3.5 %)	50 (86.2 %)	58
Итого (%)	6/145 (4.1 %)	15/142 (10.6 %)	6/292 (2.1 %)	265 (90.7 %)	292

**А**  
Использование результатов теста на чувствительность бактерий на анализаторе Vitek 2 в качестве эталона. В случае расхождений между этими двумя методами результаты анализа на чувствительность были подтверждены E-test. Данные представляют собой числа (с процентами) бактериальных изолятов, для которых тестирование на антимикробную чувствительность было конкордантным/корректным либо ошибочным согласно ПР1 (А) или ПР2 (В)

**Таблица 4:** Анализ на антимикробную чувствительность грамотрицательных неферментирующих бактерий из положительных гемокультур по ПР1 (А)а и ПР2 (В)а

Антимикробный агент	Кол-во крайне серьезных ошибок	Кол-во основных ошибок	Кол-во несуществ. ошибок	Совпадение	Общее значение
А					
Амикацин (АМК)	0/3	0/10	0/13	13 (100 %)	13
Колистин (COL)	1/1 (100 %)	1/12 (8.3 %)	0/13	11 (84.6 %)	13
Гентамицин (GM)	1/2 (50 %)	1/11 (9.1 %)	0/13	11 (84.6 %)	13
Левифлоксацин (LEV)	1/9 (11.1 %)	0/4	2/13 (15.4 %)	10 (76.9 %)	13
Итого (%)	3/15 (20 %)	2/37 (5.4 %)	2/52 (3.8 %)	45 (86.5 %)	52
В					
Амикацин (АМК)	0/4	0/10	0	14 (100 %)	14
Колистин (COL)	0/0	0/14	0	14 (100 %)	14
Гентамицин (GM)	1/3 (33.3 %)	2/11 (18.2 %)	1/14 (7.1 %)	10 (71.5 %)	14
Левифлоксацин (LEV)	0/9	0/5	2/14 (14.3 %)	12 (85.7 %)	14
Итого (%)	1/16 (6.2 %)	2/40 (5 %)	3/56 (5.3 %)	50 (89.3)	56

А  
Использование результатов теста на чувствительность бактерий на аппарате Vitek 2 в качестве эталона. В случае расхождений между этими двумя методами результаты анализа на чувствительность были подтверждены E-test. Данные представляют собой числа (с процентами) бактериальных изолятов, для которых тестирование на антимикробную чувствительность было конкордантным/корректным либо ошибочным согласно ПР1 (А) или ПР2 (В)

Для энтеробактерий (Таблица 3) абсолютное совпадение чувствительности к антибиотикам было у 88.1 по ПР1, и у 90.7 по ПР2. Согласно ПР1 было выявлено 26/148 (17.6 %) основных ошибок, и 10/301 (3.3 %) несущественных ошибок; а по ПР2 обнаружили 6/145 (4.1 %) крайне серьезных ошибок, 15/142 (10.6 %) основных ошибок, и 6/292 (2.1 %) несущественных ошибок. Согласно ПР2 все крайне серьезные ошибки наблюдались в отношении цефотаксима, тогда как 94.9 % совпадения по чувствительности для этого антибиотика. И напротив цефтазидим достигал значительно более высоких значений ( $p < 0.05$ ) в совпадении чувствительности по ПР2, чем по ПР1 (76.7 %). Интересно, что совпадение чувствительности для левифлоксацина было 100% - как по ПР1, так и по ПР2. Аналогичное совпадение ниже 90% наблюдалось в случае гентамицина и меропенема по обоим протоколам ПР1 и ПР2.

Для неферментирующих бактерий (Таблица 4) безоговорочным совпадением чувствительности к антибиотикам было 86.5 по ПР1, и 89.3 по ПР2. Согласно ПР1 было выявлено 3/15 (20 %) крайне серьезных ошибок, 2/37 (5.4%) основных ошибок, и 2/52 (3.8 %) несущественных ошибок; а по ПР2 обнаружили 1/16 (6.2 %) крайне серьезных ошибок, 2/40 (5 %) основных ошибок, и 3/56 (5.3 %) несущественных ошибок. Интересно, что совпадение чувствительности для амикацина было 100% - как по ПР1, так и по ПР2. Совпадение чувствительности для колистина было также 100% по ПР2. Совпадение чувствительности ниже 90% наблюдалось в случае гентамицина и левифлоксацина по обоим протоколам ПР1 и ПР2, а в случае колистина по ПР1.

#### **Прямой анализ на чувствительность к антибиотикам грамположительных кокков**

Было проанализировано 103 грамположительных кокка на чувствительность к антимикробным препаратам, из них 76 (73.8 %) - коагулазонегативные стафилококки, 17 (16.5 %) - золотистые стафилококки *S. aureus*, 8 (7.8 %) *Enterococcus spp.*, и 2 (1.9 %) - стрептококки, не исследовались *S. epidermidis* по ПР1, и 6 изолятов (3 штамма *S. hominis*, 1 штамм *S. aureus*, 1 штамм *Enterococcus faecium*, 1 штамм *S. pneumoniae*) по ПР2.

Тестирование на антимикробную чувствительность грамположительных кокков (Таблицы 5 и 6) проводилось из общего числа в 305 и 290 комбинаций изолят/антимикробный агент по ПР1 и ПР2 соответственно. Расхождения в результатах чувствительности к антибиотикам между прямым и обычно принятым методом исследовались с помощью метода Etest дополнительно, который показал, что анализ на чувствительность к антибиотикам был верным по ПР1 либо по ПР2, а не по обычно принятому методу для 13 (4.3) и 14 (4.8 %) комбинаций изолят/антимикробный агент соответственно и только в отношении коагулазонегативных стафилококков. Результаты анализа на чувствительность по ПР1 и ПР2 и процент ошибок отражены в Таблицах 5 и 6. Полное совпадение чувствительности к антибиотикам было выявлено для 81 (78.6 %) изолятов по ПР1 и 79 (76.7 %) по ПР2, а также для всех штаммов *S. aureus* по ПР1. Вместе 93.1 и 93.8% комбинаций изолят/антимикробный агент показали совпадающие результаты анализа на чувствительность к антибиотикам для грамположительных кокков по ПР1 и ПР2 одинаково. Следует отметить, что совпадение по

чувствительности к линезолиду было 99 и 100 %, соответственно, по ПР1 и ПР2. В целом не было обнаружено существенной разницы в точности между ПР1 и ПР2 для грамположительных кокков ( $0,5 < P < 0,9$ ). Для стафилококков (Таблица 5) по ПР1 было выявлено 1/66 (1.5 %) крайне серьезных ошибок, 12/210 (5.7 %) основных ошибок, и 5/276 (1.8 %) несущественных ошибок, а по ПР2 - 3/64 (4.7 %) крайне серьезных ошибок, 11/203 (5.4 %) основных ошибок, и 3/267 (1.1 %) несущественных ошибок. Все крайне серьезные ошибки наблюдались при исследовании цефокситина, как по ПР1 (один случай), так и по ПР2 (три случая). Совпадение по чувствительности было более 90% для всех антибиотиков, тестируемых по ПР1, и для всех кроме цефокситина по ПР2. Полное совпадение по чувствительности наблюдалось в случае линезолида по ПР2.

**Таблица 5.** Анализ на антимикробную чувствительность стафилококков из положительных гемокультур по ПР1 (А)а и ПР2 (В)а

Антимикробный агент	Кол-во крайне серьезных ошибок	Кол-во основных ошибок	Кол-во несуществ. ошибок	Совпадение	Общее значение
А					
Цефокситин (CFX)	1/63 (1.6 %)	5/29 (17.2 %)	2/92 (2.2 %)	84 (91.3 %)	92
Линезолид (LZ)	0/3	1/89 (1.1 %)	0/92	91 (98.9 %)	92
Тейкопланин (TEI)	0/0	6/92 (6.5 %)	3/92 (3.3 %)	83 (90.2 %)	92
Итого (%)	1/66 (1.5 %)	12/210 (5.7 %)	5/276 (1.8 %)	258 (93.5 %)	276
В					
Цефокситин (CFX)	3/61 (4.7 %)	4/28 (14.3 %)	3/89 (3.4 %)	79 (88.7 %)	89
Линезолид (LZ)	0/3	0/86	0/89	89 (100 %)	89
Тейкопланин (TEI)	0/0	7/89 (7.9 %)	0/89	82 (92.1 %)	89
Итого (%)	3/64 (4.7 %)	11/203 (5.4 %)	3/267 (1.1 %)	250 (93.7 %)	267

А  
Использование результатов теста на чувствительность бактерий на аппарате Vitek 2 в качестве эталона. В случае расхождений между этими двумя методами результаты анализа на чувствительность были подтверждены E-test. Данные представляют собой числа (с процентами) бактериальных изолятов, для которых тестирование на антимикробную чувствительность было конкордантным/корректным либо ошибочным согласно ПР1 (А) или ПР2 (В)

Для стрептококков/энтерококков (Таблица 6), отражающих только 9.7% всех протестированных грамположительных кокков, согласно ПР1 было выявлено 1/6 (16.7 %) крайне серьезных ошибок, и 2/23 (8.7 %) основных ошибок, а по ПР2 - 1/20 (5 %) основных ошибок. Полное совпадение для всех изолятов наблюдалось для линезолида как по ПР1, так и по ПР2, а также для ампициллина по ПР2. Совпадение чувствительности ниже 90% было получено в случае тейкопланина как по ПР1, так и по ПР2, а также в случае ампициллина по ПР1.

### Обсуждение результатов

За последние несколько лет быстрое развитие метода MALDI-TOF MS позволило быстро идентифицировать виды возбудителей из положительных гемокультур [10, 11, 24–30]. В настоящем исследовании прямой анализ MALDI-TOF использовался для быстрого идентификации из мономикробных гемокультур, как было описано ранее [11]. Совпадающая идентификация грамотрицательных бактерий и грамположительных кокков прямым методом MALDI-TOF по сравнению с обычно принятым методом составила 97.5 % и 96.1 % соответственно, подтверждая, что прямой метод MALDI-TOF может эффективно применяться для идентификации бактерий из положительных гемокультур [11, 27, 29, 30]. Однако следует отметить, что оценочные показатели  $\geq 2.000$  считаются вероятной идентификацией видов. Аналогичные наблюдения были опубликованы другими авторами [28, 30, 31]. Таким образом доступность результатов быстрой идентификации с помощью этого метода позволяет сделать выбор подходящей панели антибиотиков для прямого исследования чувствительности к антибиотикам на основе имеющихся для новой системы. Основным выводом из настоящего исследования состоит в том, что предлагаемый метод прямого исследования чувствительности может применяться для обеспечения врачей достоверными результатами за несколько часов. Результаты чувствительности для грамотрицательных бактерий, полученные с помощью двух различных протоколов ПР1 и ПР2, совпадают с результатами, полученными обычно принятым методом на 87.8 и 90.5 % комбинаций изолятов/антимикробных агентов соответственно. Для грамотрицательных бактерий левофлоксацин показал совпадение по клиническим категориям  $>90$  % согласно обоим протоколам ПР1 и ПР2, где крайне серьезные ошибки  $<3$  %, а основные и несущественные ошибки вместе  $<7$  %, таким образом удовлетворяя критериям отбора для тестирования на антимикробную чувствительность, предложенным Йоргенсенем [32].

**Таблица 6.** Анализ антимикробной чувствительности стрептококков/энтерококков из положительных гемокультур по ПР1 (А) и ПР2 (В)а

Антимикробный агент	Кол-во крайне серьёзных ошибок	Кол-во основных ошибок	Кол-во несуществ. ошибок	Совпадение	Общее значение
<b>А</b>					
Ампициллин (АМР)	1/5 (20 %)	0/4	0/9	8 (88.9 %)	9
Линезолид (LZ)	0/0	0/10	0/10	10 (100 %)	10
Тейкопланин (ТЕI)	0/1	2/9 (22.2 %)	0/10	8 (80 %)	10
<b>Итого (%)</b>	<b>1/6 (16.7 %)</b>	<b>2/23 (8.7 %)</b>	<b>0/29</b>	<b>26 (89.7 %)</b>	<b>29</b>
<b>В</b>					
Ампициллин (АМР)	0/3	0/4	0/7	7 (100 %)	7
Линезолид (LZ)	0/0	0/8	0/8	8 (100 %)	8
Тейкопланин (ТЕI)	0/0	1/8 (12.5 %)	0/8	7 (87.5 %)	8
<b>Итого (%)</b>	<b>0/3</b>	<b>1/20 (5 %)</b>	<b>0/23</b>	<b>22 (95.7 %)</b>	<b>23</b>

А  
Использование результатов теста на чувствительность бактерий на аппарате Vitek 2 в качестве эталона. В случае расхождений между этими двумя методами результаты анализа на чувствительность были подтверждены E-test. Данные представляют собой числа (с процентами) бактериальных изолятов, для которых тестирование на антимикробную чувствительность было /корректным либо ошибочным согласно PR1 (А) или PR2 (В)

Для энтеробактерий было выявлено 100% совпадение в отношении левофлоксацина как по ПР1, так и по ПР2, 94.9 % в случае цефотаксима по ПР1 и 93.1 % - в случае цефтазидима по ПР2. Самое низкое совпадение было выявлено в случае цефтазидима по ПР1 (значительно ниже, чем по ПР2). К сожалению, тестирование меропенема и цефтазидима не выполнялось для неферментирующих бактерий. Несмотря на то что количество неферментирующих бактерий было низким, 100% совпадение наблюдалось в случае амикацина по ПР1 и ПР2. В целом для грамотрицательных бактерий не было выявлено существенной разницы в точности между протоколами ПР1 и ПР2. Результаты анализа на чувствительность к антибиотикам у грамположительных кокков по ПР1 и ПР2 были совпадали с результатами, полученными с помощью обычно принятого метода, и составили 93.1 и 93.8 % комбинаций изолят/комплекс антибиотиков соответственно. Цефокситин (91.3 %) и линезолид (99.0 %) по ПР1, а также линезолид (100 %) и тейкопланин (91.8 %) по ПР2 показали совпадение в клинических категориях >90 %, где линезолид отвечает критериям выбора, предложенным Йоргенсенем, как по ПР1, так и по ПР2. За исключением цефокситина (88.7 %) по ПР2, наблюдалось совпадение >90 % у всех антимикробных агентов, тестируемых со стафилококками как по ПР1, так и по ПР2. Оптимальные результаты были получены для изолятов золотистого стафилококка *S. aureus* по ПР1, где 17/17 изолятов показали полное совпадение чувствительности к антибиотикам с текущим методом. Несмотря на то что количество тестируемых стрептококков/энтерококков было минимальным, 100% совпадение наблюдалось в случае линезолида по ПР1 и ПР2, а также ампициллина по ПР2. В целом для грамположительных кокков существенной разницы в точности между ПР1 и ПР2 не обнаружено. Время, которое требуется по ПР1 от положительного результата анализа гемокультур до результатов чувствительности к антибиотикам — около 4 часов, включая около 30 минут для подготовки бактериальной суспензии и получение результатов идентификации, и трехчасовую инкубацию для большинства тестируемых антибиотиков. Для антибиотиков, которым требуется пятичасовая инкубация, необходимо 6 часов для получения результатов чувствительности по ПР1. Время, которое требуется по ПР2 от положительного результата анализа гемокультур до результатов чувствительности к антибиотикам более переменное, в зависимости от времени, необходимого для получения суспензии 0,5 МакФарланд (1-4 часа), и вся процедура может занять до 9 часов. На основании этих наблюдений, ПР1 предпочтительнее ПР2.

## Выводы

Наиболее важный вывод из настоящего исследования заключается в том, что предлагаемый метод позволяет получать быстрые и надежные результаты чувствительности к антибиотикам, что часто имеет жизненно важное значение для подтверждения или коррекции антибактериальной терапии у пациентов с инфекцией кровотока. Кроме того, раннее введение соответствующей антимикробной терапии также сократит возникновение антимикробных резистентных штаммов. Результаты были особенно благоприятны для грамположительных кокков, которые часто дают менее точные результаты, чем грамотрицательные бактерии при тестировании напрямую из положительных гемокультур. В частности 100% совпадение наблюдалось в случае левофлоксацина для энтеробактерий по обоим протоколам, а также 99.0 и 100% совпадение наблюдалось в случае линезолида для грамположительных кокков по ПР1 и ПР2 соответственно. Ограничение данного исследования заключается в том, что время получения результата не подвергалось точному измерению.



Дальнейшие исследования с участием большого количества образцов крови и антибиотиков необходимо для полной оценки потенциала этого нового метода. Важнейший прогресс в лечении пациентов с точки зрения клинической и финансовой выгоды следует ожидать при внедрении в клинических микробиологических лабораториях

### **Дополнительный файл**

**Дополнительный файл 1. Таблица S1.** Количество чувствительных, промежуточных и резистентных изолятов для каждого вида/соединения антимикробного агента в соответствии с текущим методом: Энтеробактерии (A), грамотрицательные неферментирующие бактерии (B), стафилококки (C) и стрептококки-энтерококки (D). (DOCX 17 kb)

**Аббревиатуры:** AST тестирование на антимикробную чувствительность, BC гемокультура, BSI инфекции кровотока, ID идентификация, MALDI-TOF времяпролётная масс-спектрометрия с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы, PR1 протокол 1, PR2 протокол 2, MIC – минимальная бактериостатическая концентрация.

### **Благодарность**

Авторы отдают должное покойному профессору Марио Кампа за его многолетнее вдохновение и поддержку.

Часть материалов исследования была любезно предоставлена Alifax SpA (PD, Италия).

### **Финансирование**

Это исследование имело поддержку исследовательского гранта от Итальянского контракта № 2012WJSX8K\_005. “Ministero dell’Istruzione, dell’Università e della Ricerca”

### **Доступность материалов и данных**

Наборы данных, проанализированных в настоящем исследовании доступны по соответствующему запросу автору.

### **Вклад авторов**

Эксперимент задуман и разработан Симоной Барнини, Антонеллой Лупетти. Эксперимент выполнен Вероникой Брукулери, Паолой Морици. Анализ данных: Симоной Барнини, Вероника Брукулери, Вальтер Флорио, Антонелла Лупетти. Авторы рукописи: Вальтер Флорио, Эмилия Желарди, Антонелла Лупетти. Все авторы прочитали и утвердили окончательную рукопись.

### **Конфликт интересов**

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов

### **Согласие на публикацию**

Не подлежит

### **Утверждение этики и согласие на участие**

Исследование было зарегистрировано и утверждено местным комитетом по этике, Comitato Etico di Area Vasta Nord-Ovest, Университет Пизы, и проведено в полном соответствии с принципами Декларации Хельсинки. Образцы были взяты как часть стандартного лечения пациентов и использовались анонимно. Для этого типа исследования не требовалось письменное информированное согласие, поскольку исследование проводили с использованием других отработанных биологических образцов, и личная информация была удалена и уничтожена.

### **Информация об авторах**

1Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Пиза, Италия. 2Dipartimento di Ricerca Traslationale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa, Пиза, Италия.

Получено: 14 апреля 2016г. Утверждено: 4 августа 2016 г.

Опубликовано он-лайн: 12 августа 2016

### **Использованная литература**

1. Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B. Клиническое воздействие быстрого теста на чувствительность in vitro и идентификация бактерий. Журнал (Ж) Клиническая микробиология 1994;32:1757–62.
2. Varenfanger J, Drake C, Kasich G. Клиническое и финансовое преимущество быстрой идентификации бактерий и тестирования на антимикробную чувствительность. (Ж) Клиническая микробиология 1999;37:1415–8.
3. Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T, Hakkaart-van Roijen L, Goessens W, Verbrugh HA, et al. Быстрая идентификация и тестирование на антимикробную чувствительность уменьшает использование антибиотиков и ускоряет действие антибиотика, направленного против возбудителя. Ж Antimicrob Chemother. 2008;61:428–35.
4. Vlek AL, Bonten MJ, Boel CH. Прямая времяпролётная масс-спектрометрия с лазерной ионизацией и десорбцией из

- жидкой матрицы уточняет целесообразность терапии антибиотиками бактериемии. *PLoS One*. 2012;7:e32589.
5. Kollef MH, Ward A, Sherman G, Prentice D, Schaiff R, Huey W, et al. Неадекватное лечение внутрибольничных инфекций связано с определенным эмпирическим выбором антибиотиков. *Реаниматология* 2000;28:3456–64.
  6. Parcell BJ, Orange GV. Анализ ПНК-Флуоресцентная гибридизация in situ FISH для раннего целевого лечения бактериемии. *Ж. Микробиологические методы* 2013;95:253–5.
  7. Pletz MW, Wellinghausen N, Welte T. Улучшает ли полимеразная цепная реакция (ПЦР) - основанная на диагностике, исход у пациентов с сепсисом? *Клинический взгляд. Реаниматология* 2011;37:1069–76.
  8. Lupetti A, Barnini S, Dodi C, Menconi M, Favre C, Giagnoni M, et al. - Новые быстрые методы не могут заменить текущий в диагностике инфекций кровотока. *Ж. Медицинская микробиология* 2014;63:767–9.
  9. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS в микробиологической диагностике-идентификации микроорганизмов и за её пределами (Мини-обзор). *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93:965–74.
  10. Clerc O, Prod'homme G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Воздействие времяпролётной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы на клиническое лечение пациентов с грамотрицательной бактериемией: перспективное неэкспериментальное исследование *Clin Infect Dis*. 2013;56:1101–7.
  11. Barnini S, Ghelardi E, Bruculeri V, Morici P, Lupetti A. Быстрая и надежная идентификация грамотрицательных бактерий и грамположительных кокков с помощью осаждения бактерий, собранных из гемокультур на планшет MALDI-TOF *BMC Microbiol*. 2015;15:124.
  12. Hansen DS, Jensen AG, Nørskov-Lauritsen N, Skov R, Bruun B. Прямая идентификация и анализ на чувствительность кишечных палочек из положительных гемокультур на аппарате VITEK (GNI+/GNS-GA) *Clin Microbiol Infect*. 2002;8:38–44.
  13. Ling TK, Liu ZK, Cheng AF. Оценка системы VITEK 2 для быстрой прямой идентификации и анализа на чувствительность грамотрицательных бактерий из положительных гемокультур. *Ж. Клиническая микробиология* 2003;41:4705–7.
  14. Bruins MJ, Bloembergen P, Ruijs GJ, Wolfhagen MJ. Идентификация и анализ на чувствительность энтеробактерий и синегнойной палочки методом прямого посева из пробирок BACTEC с положительными гемокультурами на VITEK 2. *Ж. Клиническая микробиология* 2004;42:7–11.
  15. Funke G, Funke-Kissling P. Использование автоматизированной микробиологической системы BD PHOENIX для прямой идентификации и анализа на чувствительность грамотрицательных палочек из положительных гемокультур в трехфазном исследовании. *Ж. Клиническая микробиология* 2004;42:1466–70.
  16. Lupetti A, Barnini S, Castagna B, Nibbering PH, Campa M. Быстрая идентификация и анализ на чувствительность грамположительных кокков в гемокультурах методом прямого посева в системы BD phoenix. *Инфекционная клиническая микробиология* 2010;16:986–91.
  17. Beuving J, van der Donk CF, Linssen CF, Wolffs PF, Verbon A. Оценка прямого посева на системах BD phoenix из положительных гемокультур BACTEC как для грамположительных кокков, так и грамотрицательных палочек. *BMC Microbiol*. 2011;11:156.
  18. Barnini S, Morici P, Ghelardi E, Nibbering PH, Campa M, Saponi продвижение быстрой идентификации и анализа профиля на антимикробную чувствительность грамположительных и грамотрицательных бактерий в гемокультурах с применением системы VITEK 2. *Евр. Ж. Клиническая биология инфекционные заболевания Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32:493–502.
  19. Florio W, Barnini S, Morici P, Lupetti A. Прямой посев положительных гемокультур с применением системы phoenix для тестирования на антимикробную чувствительность как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. *Ж. Медицинская микробиология* 2015;64:582–5.
  20. Gherardi G, Angeletti S, Panitti M, Pompilio A, Di Bonaventura G, Crea F, et al. Сравнительная оценка Vitek-2 compact и системы phoenix для быстрой идентификации и тестирования чувствительности к антибиотикам напрямую из гемокультур грамотрицательных и грамположительных изолятов. *Диагностика микробиологических инфекционных болезней* 2012;72:20–31.
  21. Wimmer JL, Long SW, Cernoch P, Land GA, Davis JR, Musser JM, et al. Стратегия для быстрой идентификации и тестирования чувствительности к антибиотикам грамотрицательных бактерий, напрямую выделенных из положительных гемокультур с применением bruker MALDI biotyper и системы BD phoenix. *Ж. Клиническая микробиология* 2012;50:2452–4.
  22. Lahanas S, Stathopoulos G, Chan RC, van Hal SJ. Оценка аппарата Alfred 60/AST для скринингового теста на инфекции мочевых путей. *Ж. Клиническая микробиология* 2013;51:3406–8.
  23. Европейский комитет по тестированию антимикробной чувствительности (EUCAST) Европейского общества клинической микробиологии и инфекционных болезней (ESCMID). EUCAST предписывающий документ E. DEF 2. 1 августа 2000. Определение пограничных значений теста на антимикробную чувствительность. *Клинич. Микроб. Инфекц.* 2000;6:570–2.
  24. La Scola B, Raoult D. Прямая идентификация бактерий в пробирках с положительными гемокультурами с помощью времяпролётной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы. *PLoS One*. 2009;4:e8041
  25. Machen A, Drake T, Wang YF. Однодневная идентификация и полная панель тестирования на антимикробную чувствительность бактерий из пробирок с положительными гемокультурами, которая стала возможной благодаря комбинированному методу лизис-фильтрации и масс-спектрометрии MALDI-TOF VITEK и системы VITEK2 *PLoS One*. 2014;9:e87870.
  26. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Быстрая идентификация бактерий в жидкой среде положительных гемокультур с помощью времяпролётной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы. *Ж. Клиническая микробиология* 2010;48:444–7.
  27. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobotta I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Быстрая идентификация бактерий из пробирок с положительными гемокультурами с применением времяпролётной масс-спектрометрии идентификационных отпечатков с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы. *Ж. Клиническая микробиология* 2010;48:1584–91.
  28. Lagacé-Wiens PR, Adam HJ, Karlowsky JA, Nichol KA, Pang PF, Guenther J, et al. Идентификация изолятов гемокультур напрямую из положительных гемокультур с применением времяпролётной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы и системы коммерческой экстракции: анализ производительности, стоимости и времени обработки. *Ж. Клиническая микробиология* 2012;50:3324–8.
  29. Fothergill A, Kasinathan V, Hyman J, Walsh J, Drake T, Wang YF. Быстрая идентификация бактерий и дрожжей из пробирок с положительными гемокультурами с применением метода лизис-фильтрации и времяпролётной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы и базы данных SARAMIS *Ж. Клиническая микробиология* 2013;51:805–9.
  30. Buchan BW, Riebe KM, Ledebner NA. Сравнение системы MALDI Biotyper с применением селекционной обработки видов Sepsityper и рутинных микробиологических методов для идентификации бактерий из пробирок с положительными гемокультурами. *Ж. Клиническая микробиология* 2012;50:346–52.
  31. Saffert RT, Cunningham SA, Mandrekar J, Patel R. Сравнение трех подготовительных методов для выявления бактериемии с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF. *Диагностика микроб. инфекц. болезней* 2012;73:21–6.
  32. Jorgensen JH. Критерии выбора для системы тестирования на антимикробную чувствительность. *Ж. Клиническая микробиология*. 1993;31:2841–4.