

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

**Киселева Е.Е., Кайтанджан Е.И., Стижак Н.П., Бурyleв В.В.,
Чеботкевич В.Н., Бессмельцев С.С.**

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ И ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ И МИКРОМИЦЕТОВ В КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии
Федерального-медико-биологического агентства», 191024, г. Санкт-Петербург

**Kiseleva E.E., Kaytandzhan E.I., Stizhak N.P., Burylev V.V.,
Chebotkevich V.N., Bessmeltsev S.S.**

IMPROVEMENT OF LABORATORY METHODS OF EARLY DETECTION AND SPECIES IDENTIFICATION OF BACTERIA AND MICROMYCETES IN BLOOD WITH THE USE OF PCR IN THE «REAL TIME» MODE

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology FMBA of Russia,
St. Petersburg, 191024, Russian Federation

В статье описан метод раннего выявления и видовой идентификации бактерий и микромицетов в крови больных с инфекциями кровотока на основе молекулярно-биологического метода. Разработанный метод основан на получении гемокультуры в автоматическом анализаторе бактерий с последующей идентификацией микроорганизмов с использованием ПЦР «в реальном времени». Эффективность метода в отношении взрослых пациентов составила 95,5%. Показано, что процесс видовой и родовой идентификации патогенов с использованием ПЦР-РВ сокращается до 5–7 ч, что важно для проведения своевременной этиотропной терапии.

Ключевые слова: *инфекции кровотока; ПЦР-РВ; гемокультивирование, инфекционные осложнения.*

Для цитирования: Киселева Е.Е., Кайтанджан Е.И., Стижак Н.П., Бурyleв В.В., Чеботкевич В.Н., Бессмельцев С.С. Совершенствование лабораторных методов раннего выявления и видовой идентификации бактерий и микромицетов в крови с использованием ПЦР в режиме «реального времени». *Медицина экстремальных ситуаций.* 2018; 20(1): 72–78.

Для корреспонденции: Чеботкевич Виталий Николаевич, д-р мед. наук профессор, руководитель лаборатории бактериологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», 191024, Санкт-Петербург. E-mail: vitnikcheb@mail.ru

The article describes a method for the early detection and species identification of bacteria and micromycetes in the blood of bloodstream infections patients on the base of the molecular biological method. The developed method is based on obtaining hemoculture in an automatic analyzer of bacteria with the subsequent identification of microorganisms with the use of real-time PCR. The efficacy of the method for adult patients was 95.5%. The process of species and generic identification of pathogens

using PCR-RV was shown to be reduced up to 5-7 hours, which is important for the timely implementation of the etiotropic therapy.

Key words: blood flow infections; PCR-RV; hemoculture, infectious complications.

For citation: Kiseleva E.E., Kaytandzhan E.I., Stizhak N.P., Burylev V.V., Chebotkevich V.N., Bessmeltsev S.S. Improvement of laboratory methods of early detection and species identification of bacteria and micromycetes in blood with the use of PCR in the “real time” mode. *Meditsina ekstremal'nykh situatsiy (Medicine of Extreme Situations)* 2018; 20(1): 72-78. (In Russ.).

For correspondence: Vitaly N. Chebotkevich, MD, PhD, DSci., professor, head of the laboratory of bacteriology of the Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology FMBA of Russia, St. Petersburg, 191024, Russian Federation. E-mail: vitnikcheb@mail.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received: 20 January 2017

Accepted: 02 February 2018

Лабораторная диагностика бактериемий и фунгемий остается одной из наиболее важных задач клинической микробиологии. Это в значительной степени связано с изменением структуры инфекционных агентов, повышением удельного веса условно-патогенных микроорганизмов и распространением лекарственно-устойчивых и атипичных форм, увеличением частоты ассоциированных вирусно-бактериальных и грибковых инфекций, лечение которых требует принципиально различных подходов [1].

Бактериемии и сепсис являются тяжелыми осложнениями у гематологических больных, пациентов отделений интенсивной терапии, а также у лиц, подвергающихся воздействию неблагоприятных экологических и производственных факторов [2, 3]. Своевременная диагностика бактериемии способствует принятию ранних и адекватных лечебных действий, которые могут предотвратить развитие сепсиса и его последствий, связанных с высокой летальностью [4, 5].

В настоящее время «золотым стандартом» лабораторной диагностики бактериемий и сепсиса считается микробиологический метод. При культивировании крови широко используется автоматическая система VacT/ALERT (bioMérieux). Она основана на регистрации количества CO₂, выделяемого бактериями в процессе жизнедеятельности. В отличие от классического метода бактериологического исследования крови, автоматические анализаторы позволяют выявить бактериемию даже на фоне интенсивной антибактериальной терапии

(за счет сорбента антибиотиков в питательной среде) и в значительно более ранние сроки, чем обычно [6].

Таким образом, использование автоматических систем позволяет значительно сократить срок проведения анализа, однако сам процесс идентификации выделенной культуры микробиологическими методами занимает не менее 48 ч. Поэтому цель исследования – совершенствование методов раннего выявления и видовой идентификации бактерий в крови с использованием технологий амплификации нуклеиновых кислот.

Материал и методы

Проанализированы результаты бактериологического анализа 4923 образцов крови больных с различными онкогематологическими заболеваниями (острые и хронические лейкозы, множественная миелома, неходжкинские лимфомы, миелодиспластический синдром и др.) с постцитостатической нейтропенией и лихорадкой, находившихся на лечении в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России в период с 1991 по 2015 г. Данные о пациентах были собраны в результате анализа историй болезни и записей в рабочих журналах, где фиксировались все положительные гемокультуры и другие микробиологические исследования.

Бактериологические анализы гемокультур проводились по единой методике в течение всего периода. Всего было изучено 542 штамма микроорганизмов (бактерий и микромицетов), полученных из гемокультур 390 больных.

С целью разработки методов раннего выявления и видовой идентификации бактерий в крови, исследовали 67 гемокультур, полученных от пациентов с множественной миеломой, острым миело- и лимфобластным лейкозом, различными формами лимфом и с инфекционными осложнениями, которые находились на лечении в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, а также от пациентов СПб ГБУЗ «Городская Мариинская больница» с такими заболеваниями, как острая пневмония, перитонит, пиелонефрит, острое нарушение мозгового кровообращения, с развитием бактериемии. Для получения гемокультуры образцы крови засеивали в аэробные и анаэробные флаконы VacT/ALERT (FA Plus и FN Plus соответственно (bioMérieux)). Культивирование в аппарате VacT/ALERT проводили в соответствии с руководством по эксплуатации прибора. У некоторых больных образцы крови забирали 2–3 и более раз за период нахождения на стационарном лечении. Фенотипическую идентификацию выделенных микроорганизмов проводили стандартными методами в соответствии с действующей документацией [7].

Выделение бактериальной ДНК из гемокультуры проводили набором для экстракции нуклеиновых кислот «ДНК-сорб-АМ» (ООО «ИЛС») в нашей модификации (добавлено предварительное центрифугирование образца для получения рабочего осадка; лизис клеток проводится без присутствия сорбента; увеличен до 200 мкл объем ТЕ-буфера, добавляемого при растворении ДНК) [8]. Для определения родовой и видовой принадлежности микроорганизмов использовались следующие наборы ООО «ИЛС»:

1. Набор реагентов «АмплиПрайм®Флоро-Ценоз-Аэробы», для выявления ДНК бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, а также *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.* (выявление до уровня рода).

2. Набор реагентов «ИМП-G+», для выявления ДНК бактерий рода *Enterococcus* (выявление до уровня рода).

3. Набор реагентов «G-», для выявления ДНК *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

4. Набор реагентов «ИМП-скрин-FL», для выявления ДНК *Escherichia coli*.

5. Набор реагентов «АмплиСенс®MRSA-скрин-титр-FL», для выявления ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, а также метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.*

6. Набор реагентов «АмплиСенс®MDR MBL-FL», для выявления генов приобретенных карбапенемаз класса металло-β-лактамаз, групп VIM, IMP, NDM.

7. Набор реагентов «АмплиСенс®MDR KPC/OXA-48-FL», для выявления генов приобретенных карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных.

8. Набор реагентов «АмплиСенс®Флоро-Ценоз/Кандиды-FL», для выявления ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*.

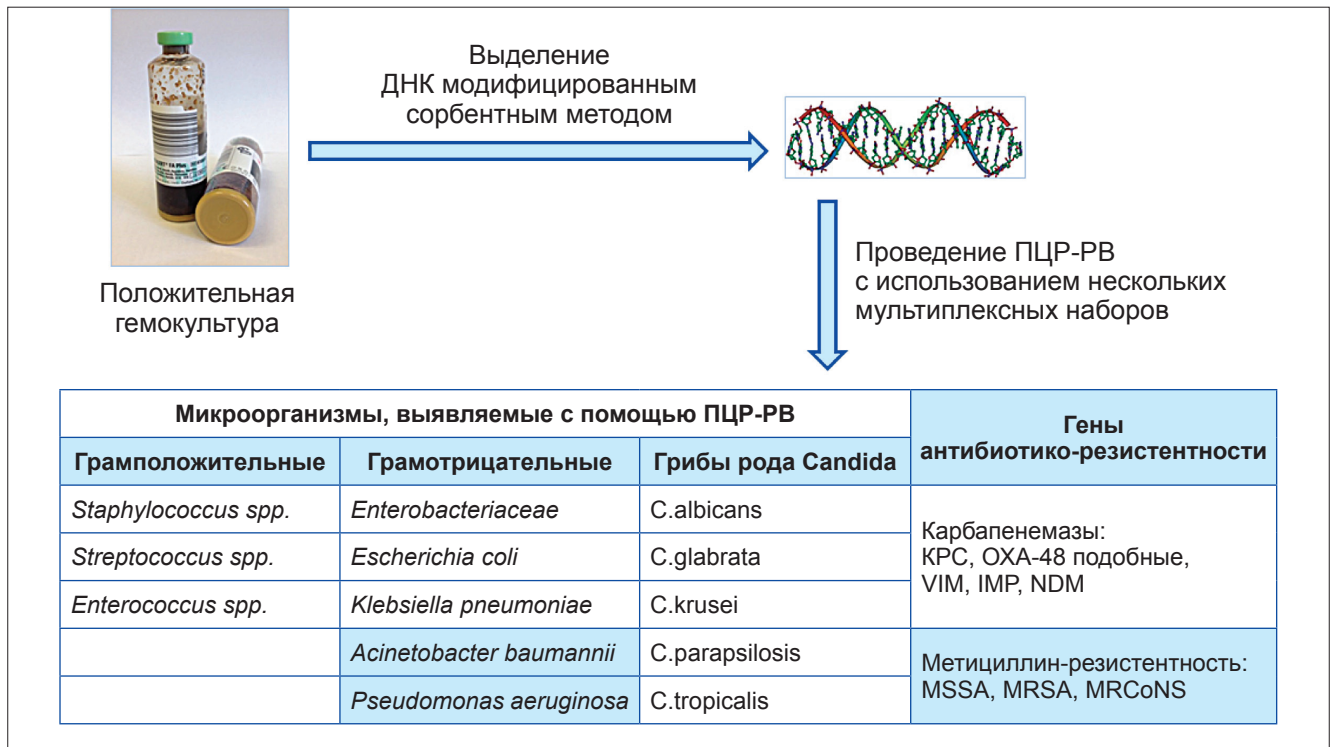
Часть наборов уже сертифицирована и коммерчески доступна, а часть находится на стадии сертификации (№ 2, 3 и 4).

Для проверки дискордантных результатов при клинической апробации используемых наборов проводилось секвенирование микроорганизмов по методу Сэнгера (метод обрыва цепи) с помощью аппарата ABI PRISM 3500xl (Applied Biosystems).

Результаты и обсуждение

Анализ данных о спектре возбудителей, выявляемых в крови онкогематологических больных, показал, что в целом, за период с 1991 по 2015 г. выделено больше грамположительных бактерий, чем грамотрицательных (68 и 32% соответственно). Тем не менее, в последние годы выявлено достоверное увеличение частоты обнаружения грамотрицательных микроорганизмов: их количество возросло с 23,1% в 1991–2001 гг. до 39,6% в 2002–2015 гг. ($p < 0,05$). Установлена также тенденция к увеличению удельного веса микромицетов среди других инфекционных агентов, что согласуется с ранее опубликованными нами данными [9, 10].

Анализ видового состава микроорганизмов в крови онкогематологических больных за последние 8 лет (2008–2015 гг.) показал, что грамположительные бактерии по-прежнему являются наиболее частыми патогенами, вы-



Метод выявления и видовой идентификации бактерий и микромицетов с помощью ПЦР-РВ.

зывающими бактериемии и сепсис у больных гемобластозами, однако значительно возросла частота выявления КНС (коагулазонегативных стафилококков) среди грамположительных бактерий (за 1991–2007 гг. она составила 60%, а за 2008–2015 гг. – 80,6%), тогда как частота выявления *S. aureus* снизилась более чем в 2 раза (до 2008 г. составляла 15,8% и 7,4% после). В отношении состава грамотрицательных бактерий значительных изменений выявлено не было.

На основании полученных данных в соответствии с выявленным спектром возбудителей были подобраны коммерческие наборы для видовой и родовой идентификации следующих видов бактерий и микромицетов с помощью ПЦР-РВ (полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени»): бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, рода *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, грамотрицательные бактерии *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, грибов рода *Candida* (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* и *C.tropicalis*). Также в панель включены наборы для определения метициллин-резистентности *Staphylococcus spp.* и выявления генов приоб-

ретенных карбапенемаз у грамотрицательных бактерий.

Установлено также, что данный спектр возбудителей охватывает и большинство инфекционных агентов, выявляемых у больных с различными заболеваниями и развившимися инфекционными осложнениями крупного многопрофильного стационара – СПб ГБУЗ «Городская Мариинская больница».

Суть разработанного нами метода состоит в следующем (см. рисунок) [11]: при подозрении на инфекции кровотока у пациента производится посев крови с дальнейшей инкубацией в автоматическом анализаторе (в соответствии с инструкцией производителя). Если рост отсутствует в течение 7 сут – результат считается отрицательным. При наличии роста (аппарат анализирует об этом), флакон незамедлительно извлекается из аппарата и отбирается проба для выделения ДНК и проведения родовой и видовой идентификации с помощью ПЦР. При выявлении бактерий рода *Staphylococcus*, дополнительно проводят определение метициллин-резистентности. При выявлении грамотрицательных бактерий, образец дополнительно проверяется на наличие генов приобретенных карбапенемаз.

Сравнительная оценка исследования гемокультур микробиологическим и разработанным методом	
Микробиологический метод (n=67)	ПЦР-РВ (n=67)
4 образца с <i>K. pneumoniae</i>	4 образца с <i>K. pneumoniae</i>
12 образцов с <i>E. coli</i> , в одном случае в сочетании с <i>E. faecium</i> .	В 11 образцах <i>E. coli</i> , в 1 – ДНК бактерий сем. <i>Enterobacteriaceae</i> (не <i>E. coli</i>). + была обнаружена ДНК других микроорганизмов: в двух случаях – <i>Enterococcus</i> spp., в третьем – <i>MSSA</i>
2 образца с <i>Enterobacter</i> spp.	В 2 образцах бактерии сем. <i>Enterobacteriaceae</i> , в одном дополнительно обнаружена ДНК <i>K.pneumoniae</i>
5 образцов с <i>Candidaalbicans</i> , в 1 случае в сочетании с <i>Staphylococchominis</i> .	5 образцов с <i>Candidaalbicans</i> , в одном случае в сочетании с <i>MRSA</i>
5 образцов с <i>Enterococcus</i> spp.: 1 – <i>E. faecium</i> , 1 – <i>E. gallinarum</i> , 2 – <i>E. faecalis</i> , 1 – смесь <i>E. faecalis</i> и <i>S. aureus</i>	5 образцов с <i>Enterococcus</i> spp., в одном в сочетании с ДНК <i>MRSA</i>
34 образца с <i>Staphylococcus</i> spp.: 20 – <i>S. epidermidis</i> , из них 10 являются метициллин-резистентными; 5 – <i>S. haemolyticus</i> ; 4 – <i>S. hominis</i> , 2 – <i>MRSA</i> и в 1 образце – <i>S. auricularis</i> .	34 образца с <i>Staphylococcus</i> spp: в 2 – <i>MSSA</i> , в 31 – <i>MRCоNS</i> , в 1 – <i>MSCоNS</i> (метициллин-чувствительный КНС). Было получено 3 дискордантных результата, но секвенирование подтвердило результаты ПЦР-РВ.
5 образцов с неферментирующими грамотрицательными бактериями, в 2 из них – <i>Pseudomonasaeruginosa</i>	В 2 образцах – <i>Pseudomonasaeruginosa</i> , в остальных 3 – отрицательный результат для использованных наборов. Секвенирование – <i>Stenotrophomonasmaltophilia</i> .

Проведение ПЦР позволяет сократить время идентификации возбудителя инфекций кровотока до 5–7 ч.

Для определения специфичности метода были проведены исследования с искусственной контаминацией донорской крови микроорганизмами, определяемыми разработанным методом (всего было исследовано 12 музейных штаммов и 44 свежeweыделенные культуры). В этом исследовании метод показал 100% чувствительность и специфичность. Чувстви-

тельность метода оценивалась исходя из того, что все положительные (предварительно искусственно контаминированные) пробы были выявлены данным методом. Специфичность определялась исходя из того, что результаты исследований контаминированных определенными микробами образцов были отрицательны со всеми наборами, за исключением набора на данный микроорганизм.

Чувствительность и специфичность предлагаемого метода определялись так же на ос-

новании сравнения результатов исследования гемокультур с помощью классического микробиологического метода и разработанного метода на основе ПЦР-РВ. При исследовании указанных выше 67 гемокультур совпадение результатов стандартного микробиологического и разработанного на основе ПЦР-РВ методов наблюдалось в 88,1% случаев. При этом было получено 3 дискордантных результата: в первом случае – бактериологическим методом был определён *Staphylococcus epidermidis*, а методом ПЦР-РВ – MSSA (метициллин-чувствительный *S. aureus*); во втором и третьем случае – бактериологическим методом был определён MRSA (*метициллин-устойчивый S. aureus*), а методом ПЦР-РВ обнаружена ДНК MRCoNS (*метициллин-устойчивого коагулозонегативного стафилококка*). Все три дискордантных образца были секвенированы по гену 16SpPHK и идентифицированы как *Staphylococcus aureus* для одного образца и как коагулозонегативный *Staphylococcus spp.* для двух других. Таким образом, результаты секвенирования подтвердили результаты, полученные с помощью ПЦР-РВ, и чувствительность разработанного метода возросла до 95,5% (64 образца из 67). Результаты исследований представлены в таблице. Специфичность в данном исследовании составила 100%.

Заключение

Таким образом, разработанный метод выявления и видовой идентификации бактерий и микромицетов в крови с использованием ПЦР в режиме «реального времени» показал высокую чувствительность и специфичность как в модельных опытах с искусственной контаминацией крови микроорганизмами, так и при обследовании положительных гемокультур больных. Метод может быть применен для ранней идентификации инфекционных агентов у больных гематологических стационаров, а также у других групп больных с различными заболеваниями и развившимися инфекционными осложнениями. При этом панель выявляемых патогенов может быть оптимизирована для конкретного стационара путем введения или исключения определенных микроорганизмов.

Следует особо подчеркнуть важность использования бактериологического исследования крови с применением автоматических анализаторов. Внедрение в практику разработанного метода позволит существенно сократить время проведения анализа, которое лимитируется только стадией роста микроорганизмов в автоматическом анализаторе, а процесс видовой и родовой идентификации патогенов с использованием ПЦР-РВ занимает не более 5–7 ч, в то время как для идентификации патогена в положительном флаконе классическими микробиологическими методами требуется не менее 48 ч.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chebotkevich V.N., Bessmeltsev S.S., Kiseleva E.E. et al. Bloodstream infections and herpesvirus activation following intensive chemotherapy of adult oncohematological patients. *Cellular Therapy and Transplantation*. 2016; 5(4): 21–31.
2. Valles A., Rello S., Ochagavia A. et al. Community-acquired bloodstream infection in critically ill adult patients. Impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival. *Chest*. 2003; 123(5): 1615–24.
3. *Сепсис: классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение: Практическое руководство*. Под ред. В.С. Савельева, Б.Р. Гельфанда. М.: 2013.
4. Kumar A., Roberts D., Wood K.E. et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine*. 2006;34:1589-96.
5. Козлов Р.С., Яковлев С.В., Белобородов В.Б. и др. *Антимикробная терапия сепсиса. Сепсис: классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение*. Под ред. С.Ф. Багненко, Е.Н. Байбарина, В.Б. Белобородова и др. М.; 2017: 81–112.
6. Лобзин Ю.В., Цветная А.С., Сидоренко С.В., Самойлова И.Г. Бактериологическая служба НИИ детских инфекций ФМБА России: взаимодействие науки и практики в прошлом и настоящем (к 85-летию Научноисследовательского института детских инфекций). *Клиническая практика*. 2011; 4: 62–72.
7. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ МЗ СССР № 535 от 22 апреля 1985 г.
8. Киселева Е.Е. Алгоритм выявления и видовой идентификации бактерий в крови с использованием ПЦР. *Вестник гематологии*. 2017; XIII (1): 19–24.

9. Щетинкина Е.Е., Бурyleв В.В., Кайтанджан Е.И. и др. Этиология бактериемий и сепсиса у больных гемобластозами. *Биомедицинский журнал Medline.ru*. 2014; 15: 511–8.
10. Стижак Н.П., Кайтанджан Е.И., Щетинкина Е.Е. и др. Этиология бактериемий и фунгемий у онкогематологических больных. *Проблемы медицинской микологии*. 2014; 16(2): 133–4.
11. Бессмельцев С.С., Четкин А.В., Чеботкевич В.Н. и др. *Алгоритм выявления и видовой идентификации бактерий в крови с использованием молекулярно-биологического метода: Методические рекомендации*. СПб.: Агентство «ВиТ-принт»; 2017.

REFERENCES

1. Chebotkevich V.N., Bessmeltsev S.S., Kiseleva E.E. et al. Bloodstream infections and herpesvirus activation following intensive chemotherapy of adult oncohematological patients. *Cellular Therapy and Transplantation*. 2016; 5(4): 21–31.
2. Valles A., Rello S., Ochagavia A. et al. Community-acquired bloodstream infection in critically ill adult patients. Impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival. *Chest*. 2003; 123(5): 1615–24.
3. *Sepsis: classification, clinical-diagnostic concept and treatment: A practical guide*. Ed. V.S. Savel'ev, B.R. Gel'fand. Moscow: Medicinskoe informacionnoe agentstvo; 2013. (in Russian)
4. Kumar A., Roberts D., Wood K.E. et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine*. 2006; 34: 1589–96.
5. Kozlov R.S., Jakovlev S.V., Beloborodov V.B. et al. [Antimicrobial therapy of sepsis. *Sepsis: classification, clinical diagnostic development and treatment [Sepsis: klasifikacija, kliniko-diagnosticheskaja koncepcija i lechenie]*. Moscow: Medicinskoe informacionnoe agentstvo; 2017: 81–112. (in Russian)
6. Lobzin Ju.V., Kvetnaja A.S., Sidorenko S.V., Samojlova I.G. [Bacteriological service of the Research Institute of Children's Infections FMBA Russia: the interaction of science and practice in the past and the present (on the occasion of the 85th anniversary of the Research Institute of Children's Infections). *Klinicheskaja praktika*. 2011; 4: 62–72. (in Russian)
7. On the unification of microbiological (bacteriological) research methods used in clinical diagnostic laboratories of medical and preventive institutions: the order of the USSR Ministry of Health No. 535 of April 22, 1985. (in Russian)
8. Kiseleva E.E. Algorithm of the detection and species identification of bacteria in the blood using PCR. *Vestnik gematologii*. 2017; XIII (1): 19–24. (in Russian)
9. Shhetinkina E.E., Burylev V.V., Kajtandzhan E.I. et al. [Etiology of bacteremia and sepsis in patients with hemoblastosis]. *Biomedicinskij zhurnal*. 2014; 15: 511–8. (in Russian)
10. Stizhak N.P., Kajtandzhan E.I., Shhetinkina E.E. et al. Etiology of bacteremia and fungemia in oncohematological patients. *Problemy medicinskoj mikologii*. 2014; 16(2): 133–4. (in Russian)
11. Bessmel'cev S.S., Chechetkin A.V., Chebotkevich V.N. et al. *Algorithm of the detection and species identification of bacteria in blood using molecular-biological method: Methodological recommendations [Algoritm vyjavlenija i vidovoj identifikacii bakterij v krvi s ispol'zovanijem molekularno-biologicheskogo metoda: Metodicheskie rekomendacii]*. Saint-Petersburg. Agency "ViT-print"; 2017.

Поступила 20 января 2018

Принята в печать 02 февраля 2018