

Современные методы лабораторной диагностики сепсиса

В.Н. Чеботкевич, Е.И. Кайтанджан, В.В. Бурылев, Е.Е. Щетинкина

Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

В обзоре рассмотрены методы индикации инфекционных агентов в крови, которые можно разделить на две основные группы: микробиологические и молекулярно-биологические. Первая группа методов используется и совершенствуется практически с начала возникновения микробиологии как научной дисциплины. Вторая активно разрабатывается в последние два десятилетия. Проанализированы достоин-

ства и недостатки различных методов лабораторной диагностики сепсиса и бактериемий. Показана необходимость дальнейшего совершенствования и стандартизации молекулярно-биологических методов лабораторной диагностики инфекций кровяного русла.

Ключевые слова: сепсис, бактериемия, лабораторная диагностика, NAT-технологии.

Modern Methods for Laboratory Diagnosis of Sepsis

V.N. Chebotkevich, E.I. Kaitandghan, V.V. Burylev, E.E. Shchetinkina

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Saint-Petersburg, Russia

The review deals with modern methods of indication of infectious agents in the blood. From methodological point of view, they can be divided into two main groups: bacteriologic and molecular. The first group of methods used and improved almost from the beginning of a microbiology as a science. The second one has been developing over the last two decades. The advantages and dis-

advantages of different methods of laboratory diagnosis of sepsis and bacteremia were analysed. The need for further improvement and standardization of molecular methods for laboratory diagnosis of bloodstream infections is highlighted.

Key words: sepsis, bacteremia, laboratory diagnosis, NAT-technology.

Сепсис является тяжелым осложнением многих заболеваний, особенно у иммуносупрессированных пациентов, в частности больных гемобластомами [1]. Даже в развитых странах смертность от сепсиса очень велика. В США регистрируется около 750 тыс. случаев бактериального или грибкового сепсиса, из которых 215 тыс. заканчиваются летально [2]. Высокая частота сепсиса отмечена также и

в Европе: в Германии сепсис является третьей по частоте причиной смерти [3].

История изучения сепсиса насчитывает много столетий. Само слово «сепсис» восходит к Гиппократу и в переводе с древнегреческого означает «гниение». Как медицинский термин был использован Гиппократом, откуда и перешел в другие языки. В ходе многолетнего изучения патогенеза сепсиса предложена масса определений: заражение крови, септическое состояние и т. д. Это создало терминологическую путаницу, которая затрудняет изучение данной проблемы. Значительный прогресс в терминологии был достигнут в 1992 году, когда на

Контактный адрес:
Виталий Николаевич Чеботкевич
Эл. почта: vitnikcheb@mail.ru

согласительной конференции Американской ассоциации пульмонологов и Общества интенсивной терапии был введен термин «синдром системной воспалительной реакции» (ССВР) [4]. Под ССВР понимается неспецифическая реакция на воздействие различных агрессивных факторов, таких как ишемия, воспаление, травма, инфекция.

ССВР характеризуется двумя или более из следующих признаков:

– количество лейкоцитов более 12 000 кл/мм³ или менее 4 000 кл/мм³, или более 10% незрелых форм;

– температура тела выше 38 °С или ниже 36 °С;

– пульс более 90 уд/мин.;

– частота дыхания более 20/мин.;

– парциальное давление СО₂ менее 32 мм рт. ст.

Сепсис, таким образом, попал в одну из форм ССВР на инвазию микроорганизмами при наличии очага инфекции, а также двух или более признаков ССВР. Отдельно выделяют «тяжелый сепсис», который характеризуется органной дисфункцией, нарушением тканевой перфузии и гипотензией, и «септический шок» – тяжелый сепсис с тканевой и органной гипоперфузией, гипотензией, не поддающийся адекватной инфузионной терапии. Несмотря на большое число исследований, посвященных данной проблеме, во многих вопросах изучения патогенеза сепсиса нет ясности. В первую очередь необходимо пояснить значение известных терминов «бактериемия» и «сепсис», которые часто используются в различных и порой противоположных значениях. Бактериемия характеризуется обнаружением микробов в крови и не всегда является патологическим процессом. Транзиторные формы бактериемии, продолжительностью от нескольких минут до нескольких часов, связаны с колонизацией крови нормальной микробиотой. Появление бактерий в крови наблюдается после удаления зубов, чистки зубов и даже жевании пищи при периодонтозе [5].

Ранее специфическое лечение сепсиса у больных гемобластозами рекомендовали начинать только после выявления возбудителя и установления его чувствительности к антибиотикам. С начала 80-х годов прошлого столетия стратегия лечения сепсиса у больных основывается на быстром применении эмпирической антибиотикотерапии. Одновременно у пациента берется кровь на бактериальный посев. Это позволило снизить летальность при данном тяжелом осложнении в 7 раз [6]. Ответ бактериологической лаборатории может быть получен только через 24–72 ч и может лишь подтвердить инфекционную этиологию и идентифицировать возбудителя. Таким образом, роль бактериологи-

ческой лаборатории в первый критический период возникновения сепсиса невелика, и успех лечения полностью определяется правильностью проводимой эмпирической антибиотикотерапии. В случае неэффективности проводимой эмпирической терапии критическое значение приобретает быстрая корректировка лечения, так как каждый час ее задержки повышает вероятность летального исхода на 5–8% [7]. В этот период выявление возбудителя и определение его чувствительности к антибиотикам приобретает решающее значение.

Целью данного обзора является анализ существующих и разрабатываемых методов лабораторной диагностики сепсиса.

В настоящее время культуральный метод является основным способом этиологической диагностики. Рекомендуется проводить забор крови 2–3 раза в количестве 20–30 мл. При меньшем объеме забираемой крови частота выявления возбудителей существенно снижается [8]. При культивировании крови широко используются автоматические системы, такие как BacT/ALERT (BioMerieux) и Bactec 9240 (Becton Dickinson). Обе системы основаны на регистрации количества СО₂, выделяемого бактериями в процессе жизнедеятельности. Разработан широкий спектр сред для анаэробного и аэробного культивирования. Благодаря наличию добавки сорбента антибиотиков во флаконе возможен анализ образцов, полученных от пациентов при проведении антибиотикотерапии. Также нет необходимости в использовании отдельных флаконов для грибов. Определение грибов проходит во флаконах для аэробов.

Однако срок культивирования посевов составляет 7 суток, и результат микробиологического анализа может быть получен самое раннее через 24–48 часов. Кроме того, микробиологический метод малоприменим для культивирования ряда микроорганизмов, таких как микоплазмы, нокардии, риккетсии, хламидии и др. [9]. Некоторые из этих микроорганизмов ответственны за развитие инфекционных эндокардитов, этиологическая диагностика которых очень важна для проведения целенаправленной этиотропной терапии. Поэтому в настоящее время для их диагностики используются серологические и молекулярно-биологические методы.

В связи с этим понятен интерес к разработке альтернативных чувствительных и быстрых методов диагностики сепсиса и оценки его тяжести. К таким тестам относится, в частности, определение биомаркеров сепсиса.

В настоящее время известно около 200 биомаркеров сепсиса. Однако только немногие из них

находят клиническое применение. Это, в первую очередь, «белок острой фазы» – С-реактивный протеин. Широко используется определение *прокальцитонина* (ПКТ). Прокальцитонин – предшественник гормона паращитовидной железы кальцитонина, регулирующего уровень кальция в крови. Показано, что уровень ПКТ коррелирует со степенью поражения органов при сепсисе и является важным прогностическим параметром. В плане этиологической диагностики следует отметить, что уровень ПКТ не изменяется при вирусных инфекциях, в частности при инфекции, вызванной вирусом гриппа, и значительно повышается при тяжелом течении бактериального сепсиса [10].

Другая большая группа методов диагностики сепсиса основана на использовании *технологии нуклеиновых кислот* (NAT-технологий). Данное направление интенсивно разрабатывается в настоящее время. Уже более 20 лет NAT-технологии активно используются для индикации вирусов и трудно культивируемых микробов, таких как микоплазмы, уреоплазмы, хламидии и др. В то же время разработка молекулярно-биологических технологий выявления бактерий в кровяном русле связана с большими методическими проблемами, которые будут рассмотрены ниже.

Для индикации бактерий в крови используют выявление участка генома, общего для всех бактерий (чаще всего 16S РНК), с помощью ПЦР. В дальнейшем в полученном амплификоне выявляют участки, специфичные для определенных групп бактерий. Например, разработана методика на основе ПЦР «в реальном времени» для молекулярно-биологической индикации бактерий и определения их грампринадлежности в различных биоматериалах [11]. Методика может быть использована, в частности, для определения бактериальной контаминации тромбоцитарной взвеси. Показано, что метод позволяет определять микробную контаминацию при содержании бактерий 10^1 – 10^2 КОЕ (колониеобразующих единиц) в 1 мл. В ряде случаев, например при бактериальном контроле тромбоцитарной взвеси, этого достаточно для выбраковки контаминированных образцов [12]. Кроме того, определение грампринадлежности выделенных бактерий имеет важное значение при исследовании крови у больных при сепсисе, так как течение и прогноз инфекций, вызванных грамположительными и грамотрицательными бактериями, различен.

Метод ПЦР «в реальном времени» используется также для групповой и видовой идентификации бактерий, выявленных в крови [13]. Кроме того, этот метод позволяет оценивать количество микробов в исследуемом материале [14, 15]. Это особенно

важно для выявления роли контаминации крови малопатогенными микроорганизмами, такими как зеленящий стрептококк и эпидермальный стафилококк, у онкогематологических больных с иммуносупрессией.

Перспективным направлением использования NAT-технологий может быть их применение для мониторинга антибиотикорезистентности микроорганизмов. Известно, что внедрение в практику определенных стратегий эмпирической антибиотикотерапии существенным образом способно влиять на эпидемиологию резистентности возбудителей инфекций [16]. Это особенно важно и на фоне недостаточного прогресса в области разработки и внедрения новых антимикробных препаратов [17]. Использование молекулярно-биологических методов выявления генов антибиотикорезистентности (таких как ген *mecA* у стафилококков или ген *van* у энтерококков) позволяет на 12–16 часов сократить время определения чувствительности к антибиотикам по сравнению с обычными микробиологическими методами. Однако требуются дополнительные исследования для установления корреляции NAT-тестов и фенотипической устойчивости к антибиотикам.

Большое число потенциальных возбудителей сепсиса, конечно, ограничивает возможности их видовой идентификации с помощью ПЦР. К настоящему времени разработаны наборы только для выявления основных возможных возбудителей. Однако даже эти наборы первого поколения нашли практическое применение. Накоплен определенный опыт их использования в ряде стран Европы, в том числе и в России [18].

В настоящее время имеются два подхода к применению NAT-методов для диагностики сепсиса:

- использование ПЦР для быстрой видовой идентификации микроорганизмов, выявленных микробиологически (после автоматического культивирования);
- прямое выявление нуклеиновых кислот бактерий и грибов непосредственно из биоматериала.

Однако использование обоих подходов связано с необходимостью выделения ДНК бактерий из исследуемого материала. В идеале метод выделения должен быть автоматизированным и в то же время быть недорогим и применимым для выделения как бактериальной, так и грибковой ДНК. Основные трудности, которые необходимо преодолеть, связаны с присутствием ингибиторов ПЦР в исследуемом материале, возможной контаминации используемых реагентов бактериальной и грибковой ДНК и риском контаминации во время самой процедуры экстракции [19]. Кроме того, следует учитывать,

что в образцах преобладает ДНК форменных элементов крови и содержатся только следовые количества бактериальной ДНК.

Разрабатываются также методы выделения ДНК непосредственно из биоматериалов – образцов цельной крови, плазмы и сыворотки. Экстракция из образцов цельной крови, обработанной ЭДТА, позволяет получить большее количество бактерий, чем при выделении из сыворотки или плазмы. Однако присутствие ингибиторов ПЦР в цельной крови снижает чувствительность этого метода. Показана более высокая чувствительность образцов сыворотки для диагностики бруцеллеза, несмотря на то, что представители рода *Brucella* являются факультативными внутриклеточными паразитами [19]. Это говорит о необходимости выбирать протокол экстракции при разработке стандартной процедуры выделения. Существуют автоматизированные системы прямой экстракции ДНК из цельной крови [20]. Однако их высокая стоимость ограничивает использование в практических лабораториях.

Разрабатываются и другие, неамплификационные, методы идентификации микробов. Наиболее перспективными, по нашему мнению, являются протеомные технологии с использованием *временной масс-спектрометрии* (MALDI-TOF MS) [21]. Этот метод позволяет идентифицировать бактерии и грибы по их белковому профилю [22]. Также он позволяет определять некоторые маркеры антибиотикорезистентности [23]. Основным недостатком данной технологии является невозможность ее применения непосредственно для биологических образцов. Здесь требуется предварительное культивирование образцов для увеличения числа микробных тел в пробе. Кроме того, ввиду большой стоимости оборудования этот метод является недоступным для многих лабораторий.

Как было сказано выше, имеется ряд коммерчески доступных наборов для определения инфекционных агентов в крови не микробиологическими методами. Ряд методов используется для идентификации микробов в положительных микробиологических пробах. Наиболее изученным из не микробиологических тестов является PNA-FISH (AdvanDX, США) [24]. Метод основан на гибридизации *in situ* флуоресцентно меченных пептидно-нуклеотидных проб к ограниченному набору бактерий. Метод удобен для использования, и анализ может быть выполнен за 3 часа. Заявленная фирмой чувствительность и специфичность метода близка к 99–100%.

В наборе Huplex BloodScreen (BAG, Германия) используется мультиплексная ПЦР. Возможна

идентификация нескольких бактериальных видов, включая метициллиночувствительные и метициллинорезистентные штаммы стафилококков, стрептококков и энтерококков, а также грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp.). Продолжительность проведения исследования 3–4 часа при заявленной чувствительности в дифференцировке различных видов от 96,6 до 100% и специфичности от 92,5 до 100% [25]. Метод позволяет определять маркеры резистентности – гены *van* и несколько генов β -лактамаз.

Недавно предложен набор с использованием метода микрочипов для определения большого количества видов бактерий и гена *mecA* (Mobidiag, Финляндия). Анализ занимает 3 часа с заявленной чувствительностью 94% и специфичностью 96%.

Разрабатываются также методы по индикации микробов непосредственно из крови. Набор SepsiTect (Molzys, Германия) представляет собой метод, основанный на выявлении генов 16S рРНК бактерий и генов 18S рРНК грибов [26]. Потенциально этот метод позволяет провести полную видовую дифференцировку бактерий и грибов с помощью секвенирования генома. Однако имеется большой риск контаминирования пробы на постамплификационном этапе исследований и получения ложноположительных результатов. Кроме того, секвенирование для его проведения требует 8–12 часов, что не позволяет рассматривать его как метод ранней диагностики сепсиса.

Набор Vyoо (SIRS Lab, Германия) представляет собой метод, основанный на мультиплексной ПЦР, позволяющий выявлять 35 видов бактерий, а также ряд генов антибиотикорезистентности (гены β -лактамаз, а также гены *vanA*, *vanB* и *mecA*). Общее время проведения анализа – 8 часов при заявленной чувствительности 3–10 КОЕ/мл.

Набор LightCycler SeptiFast Test (Roche Molecular Systems, США), представляет собой тест-систему в формате мультиплексной ПЦР «в реальном времени» для диагностики сепсиса. Тест-система позволяет идентифицировать около 25 видов бактерий и грибов – возбудителей нозокомальных септицемий [27].

Таким образом, в настоящее время на рынке представлен ряд методов не бактериологической диагностики, основанных, в частности, на ПЦР «в реальном времени», использование которой значительно снижает риск контаминации. Наряду с методическими трудностями их внедрения необходимо также учитывать стоимость проведения анализа, необходимость валидации и сравнения с общепринятыми методами.

На современном этапе исследований для лабораторной диагностики сепсиса возможно применение комплекса микробиологических и молекулярно-биологических методов. Дальнейшее совершенствование NAT-технологий диагностики позволит внедрить их в работу практических микробиологических лабораторий. Результаты работ, проведенных в последние годы, показали, что NAT-методы, по крайней мере, так же чувствительны, как и микробиологические. Они позволяют определять и идентифицировать в крови трудно культивируемые и даже не растущие на обычных средах бактерии и грибы. Определение генов антибиотикорези-

стентности позволяет получать быструю информацию о чувствительности инфекционных агентов к антибиотикам. Однако требуются дополнительные исследования для установления корреляции NAT-тестов и фенотипической устойчивости к антибиотикам.

На сегодняшний день, наряду с методологическими трудностями, главным препятствием внедрения NAT технологий является их высокая стоимость, однако развитие и совершенствование этих методов, безусловно, позволит удешевить их проведение и ввести NAT-тестирование в алгоритм диагностики сепсиса.

Литература

1. Mancini N., Clerici D., Diotti R., et al. Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Med Microbiol* 2008; 57:601-4.
2. Martin G.S., Mannino D.M., Eaton S., Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348:1546-54.
3. Engel C., Brunkhorst F.M., Bone H.G., et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007; 33:606-18.
4. Bone R.S., Balk R.A., Cerra F.B., et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101(6):1644-55.
5. Forner L., Larsen T., Kilian M., Holmstrup P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* 2006; 33(6):401-7.
6. Klastersky J. Empiric therapy for bacterial infections in neutropenic patients. In: Klastersky J. editor. *Infectious complications of cancer*, 1995. p. 101-11.
7. 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. *Crit Care Med* 2006; 34:1589-96.
8. Connell T.G., Rele M., Cowley D., BATTERY J.P., Curtis N. How reliable is a negative blood culture result? Volume of blood submitted for culture in routine practice in a children's hospital. *Pediatrics* 2007; 119:891-6.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. Principles and procedures for blood cultures. Approved guideline (M47-A), 2007. vol. 27; 17.
10. Руднов В.А. Сепсис: Формулировка диагноза и МКБ 10. Роль биомаркеров. Электронный источник: URL: mdtudt.ru/videos/801.
11. Ёлов А.А., Морозова О.А., Карпова О.А., Михина Л.В. Обнаружение и идентификация бактерий методом ПЦР в реальном времени на фрагментах гена рПНК оперона. *Вестник гематологии* 2012; 8(1):42-3.
12. Щетинкина Е.Е., Бурылев В.В., Стижак Н.П. Бактериальная контаминация тромбоцитарной взвеси и методы ее выявления. *Трансфузиология* 2012; 13(3):112-3.
13. Procop G.W. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. *Clin Infect Dis* 2007; 45(Suppl. 2):S99-S111.
14. Klouche M., Schroder U. Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46:888-908.
15. Hall K.K., Lyman J.A. Updated review of blood culture contamination. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:788-802.
16. Козлов Р.С., Голуб А.В. Стратегия использования антимикробных препаратов как попытка ренессанса антибиотиков. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2011; 13(4):322-34.
17. Козлов Р.С. Селекция резистентных микроорганизмов при использовании антимикробных препаратов. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2010; 12(4):284-94.
18. Попов Д.А., Вострикова Т.Ю. Первый опыт применения метода ПЦР в режиме реального времени для диагностики бактериемии в послеоперационном периоде у кардиохирургических больных. *Клин лабор диагностика* 2011; 8:49-52.
19. Queipo-Ortuno M.I., Tena F., Colmenero J.D., Morata P. Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of Brucella DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27:109-14.
20. Loeffler J., Schmidt K., Hebart H., Schumacher U., Einsele H. Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2240-3.
21. Marvin L.F., Roberts M.A., Fay L.B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 2003; 337:11-21.
22. van Baar B.L. Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiol Rev* 2000; 24:193-219.
23. Edwards-Jones V., Claydon M.A., Evason D.J., Walker J.,

- Fox A.J., Gordon D.B. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2000; 49:295-300.
24. Wilson D.A., Joyce M.J., Hall L.S., et al. Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2909-12.
25. Wellinghausen N., Wirths B., Essig A., Wassill L. Evaluation of the Hyplex BloodScreen multiplex PCR-enzyme-linked immunosorbent assay system for direct identification of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3147-52.
26. Wellinghausen N., Kochem A.-J., Disqué C., et al. Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis. *J Clin Microbiol* 2009; 47(9):2759-65.
27. Lehmann L.E., Hunfeld K.P., Emrich T., et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol* 2008; 197:313-24.