

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ MALDI-TOF-ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СЕПТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ В ПЕДИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

УДК 579:616.24-002.1-053.2-07

Поступила 28.11.2014 г.

С **И.В. Чеботарь**, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии¹;
ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии и антибактериальной терапии²;
О.А. Пономаренко, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии¹;
А.В. Лазарева, к.м.н., зав. лабораторией микробиологии¹; старший научный сотрудник лаборатории
микробиологии и антибактериальной терапии²;
О.В. Карасева, д.м.н., зам. директора по научной работе, руководитель отделения сочетанной травмы²;
А.Л. Горелик, научный сотрудник отделения сочетанной травмы²;
Ю.А. Бочарова, клинический ординатор кафедры семейной медицины с курсом клинической
лабораторной диагностики³;
Р.Ф. Тепаев, д.м.н., зав. отделением реанимации и интенсивной терапии¹

¹Научный центр здоровья детей РАМН, Москва, 119991, Ломоносовский пр., 2;

²НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва,
119180, ул. Большая Полянка, 22;

³Учебно-научный медицинский центр Управления делами Президента РФ, Москва, 121359,
ул. Маршала Тимошенко, 21

Цель исследования — оценка эффективности использования MALDI-TOF-масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов из малых объемов крови (1–4 мл), полученных от детей с подозрением на септические состояния, путем сравнения ее результатов с данными классического микробиологического исследования.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись образцы крови детей с подозрением на развитие септического состояния. Для анализа использовали гемокультуры, в которых регистрировался микробный рост на инкубаторе BACTEC 9050. Идентификацию возбудителя из гемокультуры осуществляли двумя способами — классическим микробиологическим и на основе MALDI-TOF-масс-спектрометрии с применением в качестве матрицы α -циано-4-гидроксикоричной кислоты. Для сравнения эффективности двух методов идентификации возбудителей инфекций кровотока применяли стандартный статистический прием, направленный на определение степени парной согласованности результатов, — каппы Козна.

Результаты. Данные, полученные при помощи масс-спектрометрического MALDI-TOF-метода идентификации микроорганизмов в гемокультурах от детей с инфекциями кровотока, содержащих один микроб-возбудитель, имеют высокую степень соответствия данным классического микробиологического исследования (каппа Козна составляет 0,96; $p < 0,001$). Совпадение результатов MALDI-TOF-масс-спектрометрии и классического микробиологического анализа при исследовании полимикробных культур характеризовалось слабой согласованностью (каппа Козна составляет 0,58; $p > 0,05$).

Заключение. MALDI-TOF-масс-спектрометрическая идентификация возбудителей инфекций кровотока может быть рекомендована в качестве дополнительного метода диагностики, направленного на сокращение времени анализа.

Ключевые слова: диагностика септических состояний; MALDI-TOF-масс-спектрометрия; идентификация микробов.

Для контактов: Чеботарь Игорь Викторович, e-mail: nizarnn@yandex.ru

English

MALDI-TOF Technique Availability for Identification of Septic Agents in Pediatric Practice

I.V. Chebotar, MD, DSc, Leading Researcher, Microbiology Laboratory¹; Leading Researcher, Laboratory of Microbiology and Antibacterial Therapy²;

O.A. Ponomarenko, Junior Researcher, Microbiology Laboratory¹;

A.V. Lazareva, PhD, Head of Microbiology Laboratory¹; Senior Researcher, Laboratory of Microbiology and Antibacterial Therapy²;

O.V. Karaseva, MD, DSc, Deputy Director for Science, Head of Complex Trauma Department²;

A.L. Gorelik, Researcher, Complex Trauma Department²;

J.A. Bocharova, Resident, Family Medicine and Clinical Laboratory Diagnostics Department³;

R.F. Tepaev, MD, DSc, Head of Intensive Care Unit¹

¹Scientific Centre of Children Health, Russian Academy of Medical Sciences, 2 Lomonosovsky Avenue, Moscow, 119991, Russian Federation;

²Clinical and Research Institute of Emergency Children's Surgery and Trauma, 22 Bol'shaya Polyanka St., Moscow, 119180, Russian Federation;

³Educational and Research Medical Center in the Administrative Department of the President of the Russian Federation, 21 Marshal Timoshenko St., Moscow, 121359, Russian Federation

The aim of the investigation was to assess MALDI-TOF mass spectrometry efficiency to identify microorganisms in small blood volumes (1–4 ml) in children with suspected septic conditions by comparing MALDI-TOF mass spectrometry findings with those of a classical microbiological study.

Materials and Methods. The subject of the research was blood of children with suspected septic conditions. For analysis we used blood cultures with microorganism growth recorded by BACTEC 9050. Pathogens isolated from blood culture were identified in two ways — by a classical microbiological study and MALDI-TOF mass spectrometry using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix. To compare the efficiency of two methods for blood infectious agent identification we applied a standard statistical method determining a concordance coefficient — Cohen's kappa.

Results. The findings of MALDI-TOF mass spectrometry used to identify microorganisms in blood cultures of children with bloodstream infections with one agent were compliant with those of a classical microbial study (Cohen's kappa is 0.96; $p < 0.001$). MALDI-TOF mass spectrometry and classical microbial study findings in the analysis of polymicrobial cultures had low concordance (Cohen's kappa is 0.58; $p > 0.05$).

Conclusion. MALDI-TOF mass spectroscopy identification of bloodstream infection agents can be recommended as a complimentary diagnostic technique aimed at analysis time reduction.

Key words: diagnostics of septic conditions; MALDI-TOF mass spectrometry; microbial identification.

В последние годы заболеваемость септическими состояниями — сепсисом, тяжелым сепсисом и септическим шоком — в развитых странах колеблется в диапазоне от 240 до 300 случаев на 100 000 населения в год [1]. Даже в условиях лечения в отделениях интенсивной терапии и реанимации летальность при сепсисе составляет 17,9%, при тяжелом сепсисе — от 28,6 до 50% [1, 2]. Количество зарегистрированных случаев сепсиса ежегодно увеличивается — в начале XXI в. прирост в США составлял 1,5% в год [3]. Эффективность лечения септических состояний во многом обусловлена быстрой и правильной диагностикой. Важнейшей составляющей в постановке диагноза является микробиологическое подтверждение, которое заключается в обнаружении и идентификации жизнеспособных микробов в крови. Современные способы микробиологической диагностики септических состояний базируются на трех методических идеологиях [4–6]. Наиболее распространенный способ предполагает традиционное микробиологическое культиви-

рование, направленное на получение чистой культуры возбудителя с его последующей идентификацией на основе морфологических, биохимических и серологических критериев. Метод обладает достаточно высокой чувствительностью и специфичностью, но имеет важный минус — длительность выполнения (от 48 до 96 ч). Второй подход основан на выявлении в исследуемой крови генов-маркеров того или иного вида возбудителя при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Главным достоинством ПЦР-диагностики является быстрота получения результата. Но и этот способ имеет принципиальный недостаток: положительные результаты не служат свидетельством наличия в крови живого возбудителя, они говорят лишь о присутствии в крови микробных нуклеиновых кислот, которые могут быть дериватами погибших микробов. Это часто приводит к ложноположительным результатам [6]. Третий методический подход выполняется на основе идентификации возбудителя по масс-спектрометрическому (МС) профилю его рибосомальных белков, полученному по

технологии матрица-активированной лазерной десорбции/ионизации протеинов образца — MALDI-TOF (от англ. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Time-Of-Flight*) [7]. МС-идентификация микробов в гемокультурах была успешно апробирована в диагностике бактериемий у взрослых пациентов [8]. Более того, одна из фирм-производителей масс-спектрометров (Bruker Daltonics, Германия) выпускает специальный набор MALDI Sepsityper Kit, предназначенный для пробоподготовки крови при МС-диагностике бактериемий. Однако диагностика в педиатрии принципиально отличается от взрослой: она не позволяет применять «взрослые» диагностические технологии без их предварительной адаптации как в части техники исполнения, так и в отношении интерпретации результатов. Так, проведение МС-диагностики бактериемий при помощи MALDI Sepsityper Kit ограничено невозможностью получить рекомендуемый фирмой-изготовителем объем крови для исследования (минимально — 8,0 мл) у некоторых категорий детей, например у детей с низкой и экстремально низкой массой тела, у детей после кровопотери и др. В неонатологии использование малых объемов крови, начиная от 0,5–1,0 мл, считается достаточным для достоверной диагностики бактериемий при помощи рутинных микробиологических методов [9]. Для решения этого противоречия в методику пробоподготовки крови для МС-исследования нами была включена операция дополнительного инкубирования малого объема крови (1,0–4,0 мл), полученного от ребенка и внесенного в специальную питательную среду. Аналогичные методики прединкубации крови для МС-диагностики бактериемий применялись в исследованиях взрослых пациентов [10], но при этом использовались большие объемы крови.

Цель исследования — оценка эффективности использования MALDI-TOF-масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов из малых объемов крови (1–4 мл), полученных от детей с подозрением на септические состояния, путем сравнения ее результатов с данными классического микробиологического исследования.

Материалы и методы. Объектами исследования служили образцы крови, полученные от детей из стационаров Научного центра здоровья детей РАМН и НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы. Критерием включения в исследование было подозрение на развитие септического состояния. Все образцы крови, инокулированные во флаконы для гемокультивирования, инкубировали в анализаторе гемокультур ВАСТЕС 9050 (Becton Dickinson, США) до момента регистрации микробного роста. Критерием исключения являлось отсутствие микробного роста в инкубаторе ВАСТЕС.

Немедленно после регистрации микробного роста из гемокультуры производили забор материала (4,0 мл), который разделяли на две части (обе по 2,0 мл). Первую часть высевали на плотные питательные среды для выделения чистой культуры возбудителя по классическим микробиологическим методикам. В качестве методов идентификации изолятов применяли микро-

скопическое исследование, посев на селективные и хромогенные питательные среды, иммунохимические и биохимические методы, включая использование автоматического бактериологического анализатора Vitek 2 (BioMerieux, Франция). Вторую часть (2 мл гемокультуры) использовали для масс-спектрометрического определения таксономической принадлежности возбудителя, которое выполняли согласно отработанному ранее протоколу [11]. Процедуру выделения микробных белков завершали нанесением их (по 0,001 мл) на мишень для MALDI-TOF-масс-спектрометрии. В качестве матрицы использовали α -циано-4-гидроксикоричную кислоту. Для повышения достоверности каждый образец тестировали в триплетах. Снятие спектров проводили в ручном режиме на масс-спектрометре MALDI Biotyper MicroFlex (Bruker Daltonics, Германия), диапазон спектра — 2–20 кДа. С каждого образца получали не менее 1000 спектров.

Статистическая обработка масс-спектров проводилась с помощью программы Biotyper 3.0 RTC. Степень достоверности идентификации оценивали по полученным значениям Score, сравнивая с данными спектров референсной библиотеки Biotyper 3.0. Случаи со Score <1,7 рассматривались как недостоверные и не учитывались в качестве случаев успешного определения таксономической принадлежности изолята [7]. Для сравнения эффективности двух методов идентификации возбудителей инфекций кровотока — классического микробиологического исследования и MALDI-TOF-масс-спектрометрии — применяли стандартный статистический прием, направленный на определение степени парной согласованности результатов. Для этого была использована каппа Козна — мера согласованности, которая равна максимум 1 при полной согласованности, и 0 в том случае, если согласованность между оценками (тестами) наблюдается не чаще, чем можно было бы ожидать при случайном совпадении. Значения >0,75 считаются достаточной степенью согласованности [12].

Результаты. При помощи классического микробиологического исследования тестировано 139 гемокультур, из которых было выделено 164 изолята. Спектр идентифицированных микроорганизмов включал 26 видов бактерий и 3 вида дрожжеподобных грибов (*Candida albicans* — 4 изолята, *Candida parapsilosis* — 14 изолятов и *Candida guilliermondii* — 1 изолят). Среди бактерий обнаружено 12 грамположительных видов: *Staphylococcus aureus* — 7 изолятов, *Staphylococcus capitis* — 1 изолят, *Staphylococcus epidermidis* — 33 изолята, *Staphylococcus haemolyticus* — 17 изолятов, *Staphylococcus hominis* — 11 изолятов, *Staphylococcus warneri* — 1 изолят, *Enterococcus faecalis* — 9 изолятов, *Enterococcus faecium* — 3 изолята, *Streptococcus gordonii* — 1 изолят, *Streptococcus parasanguinis* — 1 изолят, *Streptococcus vestibularis* — 1 изолят, *Streptococcus viridans* — 2 изолята. 14 идентифицированных грамотрицательных видов были представлены *Acinetobacter baumannii* — 8 изолятов, *Acinetobacter lwoffii* — 1 изолят, *Pseudomonas aeruginosa* — 9 изолятов, *Pseudomonas putida* — 1 изолят, *Stenotrophomonas maltophilia* — 7 изо-

Таблица 1

Результаты видовой идентификации микроорганизмов из гемокультур, содержащих по одному виду микроорганизма

№ п/п	Классическое микробиологическое исследование		MALDI-TOF-масс-спектрометрия	
	Идентифицированные виды	Количество случаев	Идентифицированные виды	Количество верно идентифицированных случаев
1	<i>A. baumannii</i>	3	<i>A. baumannii</i>	3
2	<i>B. ceposepacia</i>	1	<i>B. ceposepacia</i>	1
3	<i>C. albicans</i>	4	<i>C. albicans</i>	4
4	<i>C. guilliermondii</i>	1	<i>C. guilliermondii</i>	1
5	<i>C. indologenes</i>	1	<i>C. indologenes</i>	1
6	<i>C. parapsilosis</i>	12	<i>C. parapsilosis</i>	12
7	<i>E. coli</i>	1	<i>E. coli</i>	1
8	<i>E. faecalis</i>	5	<i>E. faecalis</i>	5
9	<i>E. faecium</i>	2	<i>E. faecium</i>	2
10	<i>E. cloacae</i>	1	<i>E. cloacae</i>	1
11	<i>E. kobei</i>	1	<i>E. kobei</i>	1
12	<i>K. oxytoca</i>	1	<i>K. oxytoca</i>	1
13	<i>K. pneumoniae</i>	17	<i>K. pneumoniae</i>	17
14	<i>P. aeruginosa</i>	7	<i>P. aeruginosa</i>	7
15	<i>P. putida</i>	1	<i>P. putida</i>	1
16	<i>S. aureus</i>	5	<i>S. aureus</i>	5
17	<i>S. capitis</i>	1	<i>S. capitis</i>	1
18	<i>S. epidermidis</i>	28	<i>S. epidermidis</i>	28
19	<i>S. haemolyticus</i>	12	<i>S. haemolyticus</i> (10)* <i>S. epidermidis</i> (1) <i>S. warneri</i> (1)	10
20	<i>S. hominis</i>	5	<i>S. hominis</i>	5
21	<i>S. warneri</i>	1	<i>S. warneri</i>	1
22	<i>S. maltophilia</i>	6	<i>S. maltophilia</i>	6
23	<i>S. parasanguinis</i>	1	<i>S. parasanguinis</i>	1
24	<i>S. vestibularis</i>	1	<i>S. salivarius</i>	0
25	<i>S. viridans</i>	2	<i>S. pneumoniae</i> **	0
ВСЕГО		120		115

* — в 10 образцах наблюдалось полное совпадение результатов бактериологического и масс-спектрометрического методов, в двух случаях результат MALDI-TOF-исследования был ошибочным, свидетельствуя о присутствии в образце *S. epidermidis* или *S. warneri*;
** — в обоих образцах результат MALDI-TOF-исследования был ошибочным, свидетельствуя о присутствии в образце только *S. pneumoniae*.

лятов, *Burkholderia ceposepacia* — 1 изолят, *Klebsiella pneumoniae* — 23 изолята, *Klebsiella oxytoca* — 1 изолят, *Escherichia coli* — 1 изолят, *Enterobacter aerogenes* — 1 изолят, *Enterobacter cloacae* — 2 изолята, *Enterobacter kobei* — 1 изолят, *Chryseobacterium indologenes* — 1 изолят и *Serratia marcescens* — 1 изолят.

В 120 случаях гемокультуры содержали только по одному виду микроорганизма. Из монокультур выделены 21 вид бактерий (11 — грампозитивных и 10 — грамотрицательных) и 4 вида грибов (табл. 1). Из 19 образцов были изолированы ассоциации, содержащие два или три вида микроорганизмов. Поэтому принципиальным

для анализа было разделение всех результатов на две группы. В первую группу вошли результаты, полученные при исследовании гемокультур, содержащих только один вид микроорганизма (см. табл. 1), во вторую группу были включены данные для гемокультур, содержащих более одного вида микроорганизмов, — полимикробных культур (табл. 2).

Результаты, полученные для монокультур методом MALDI-TOF, соответствовали классической идентификации в 115 случаях из 120 (95,8%) (см. табл. 1). Все несоответствия касались только грамположительных бактерий. В двух случаях ошибка отмечена при

Таблица 2

Результаты видовой идентификации микроорганизмов из гемокультур, содержащих более одного вида микроорганизмов

Гемо-культура	Классическое микробиологическое исследование (идентифицированные виды)	MALDI-TOF-масс-спектрометрия	
		Идентифицированные виды	Верная идентификация/ количество видов
1	<i>C. parapsilosis</i>	Не идентифицирован	1/3
	<i>S. epidermidis</i>	Не идентифицирован	
	<i>S. hominis</i>	<i>S. hominis</i>	
2	<i>A. baumannii</i>	Не идентифицирован	0/2
	<i>P. aeruginosa</i>	Не идентифицирован	
3	<i>S. aureus</i>	Не идентифицирован	1/2
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	
4	<i>E. faecalis</i>	Не идентифицирован	1/3
	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	
	<i>S. hominis</i>	Не идентифицирован	
5	<i>C. parapsilosis</i>	Не идентифицирован	1/2
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	
6	<i>E. aerogenes</i>	Не идентифицирован	1/2
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	
7	<i>A. baumannii</i>	Не идентифицирован	1/3
	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	
	<i>S. epidermidis</i>	Не идентифицирован	
8	<i>E. faecium</i>	Не идентифицирован	0/2
	<i>S. haemolyticus</i>	Не идентифицирован	
9	<i>S. haemolyticus</i>	Не идентифицирован	1/2
	<i>S. hominis</i>	<i>S. hominis</i>	
10	<i>A. baumannii</i>	Не идентифицирован	0/2
	<i>K. pneumoniae</i>	Не идентифицирован	
11	<i>A. baumannii</i>	Не идентифицирован	0/3
	<i>E. faecalis</i>	Не идентифицирован	
	<i>K. pneumoniae</i>	Не идентифицирован	
12	<i>A. baumannii</i>	Не идентифицирован	0/3
	<i>K. pneumoniae</i>	Не идентифицирован	
	<i>P. aeruginosa</i>	Не идентифицирован	
13	<i>K. pneumoniae</i>	Не идентифицирован	0/2
	<i>S. marcescens</i>	Не идентифицирован	
14	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	1/2
	<i>S. maltophilia</i>	Не идентифицирован	
15	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	1/2
	<i>E. faecalis</i>	Не идентифицирован	
16	<i>S. hominis</i>	<i>S. hominis</i>	1/2
	<i>A. lwoffii</i>	Не идентифицирован	
17	<i>S. hominis</i>	<i>S. hominis</i>	1/2
	<i>S. aureus</i>	Не идентифицирован	
	<i>S. epidermidis</i>	Не идентифицирован	
18	<i>S. hominis</i>	Не идентифицирован	0/3
	<i>S. epidermidis</i>	Не идентифицирован	
	<i>S. gordonii</i>	Не идентифицирован	
19	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	1/2
	<i>S. haemolyticus</i>	Не идентифицирован	
ВСЕГО	44 изолята		12 изолятов

идентификации *S. haemolyticus*: он был определен МС-методом как *S. warneri* или как *S. epidermidis*; *S. vestibularis* был ошибочно идентифицирован как *S. salivarius*; *S. viridans* в двух случаях был ошибочно определен как *Streptococcus pneumoniae*. Степень согласованности результатов, полученных двумя методами, была высокой — значение каппы Козна составило 0,96 ($p < 0,001$).

Результаты исследования полимикробных гемокультур отражены в табл. 2. В 7 образцах (36,8%) из 19 полимикробных гемокультур методом MALDI-TOF с достоверным уровнем Score не был идентифицирован ни один вид. Для остальных 12 гемокультур (63,2%) определение вида с достоверным Score зарегистрировано только для одного из возбудителей, входящих в ассоциацию. Совпадение результатов MALDI-TOF-масс-спектрометрии и классического микробиологического исследования наблюдалось лишь для 27,3% (12 штаммов) из общего количества изолятов ($n=44$) всех полимикробных культур. Степень согласованности результатов двух методов была слабой, т.е. статистически не значимой (каппа Козна составляла 0,58; $p > 0,05$).

Обсуждение. Настоящее исследование является примером удачного применения MALDI-TOF-диагностики септических состояний в детской практике — в случаях, которые требовали быстрого получения результатов, но исключали возможность использования объемов крови, превышающих 4,0 мл. Полученные нами данные говорят о двух уровнях соответствия результатов микробиологической и МС-диагностики. Первый уровень касается моногемокультур. Для грамотрицательных бактерий и грибов результаты идентификации совпадали в 100% случаев. Моногемокультуры с грампозитивными возбудителями демонстрировали неполное (92,6%), но достаточно высокое совпадение (каппа Козна — 0,89). Таким образом, мы подтвердили возможность эффективного применения для моногемокультур МС-идентификации возбудителей бактериемий, что соответствует результатам, полученным нашими коллегами ранее [13]. В целом соответствие результатов идентификации микробов из моногемокультур двумя методами было высоким и статистически доказанным.

Исследование полимикробных гемокультур показало неэффективность МС-технологии в диагностике бактериемии. Статистическая обработка данных подтвердила невозможность полноценной идентификации возбудителей, присутствующих в ассоциации, при помощи метода MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Лишь в 27,3% случаев данным методом определялся один из присутствующих возбудителей. Следует отметить, что в литера-

туре имеются и другие, более позитивные результаты MALDI-TOF-диагностики полимикробных бактериемий. Например, в работе T.J. Gray с соавт. [10] проанализировано 26 случаев полимикробных инфекций кровотока, один из возбудителей с достаточным уровнем Score был идентифицирован в 96,2% случаев. Мы полагаем, что такие результаты связаны со специальным отбором гемокультур для анализа: авторы работали только с гемокультурами, в которых первоначально при помощи световой микроскопии были обнаружены грамотрицательные бактерии (хотя другими возбудителями в ассоциации могли быть и грамположительные бактерии). Как упоминалось выше, вероятность верной MALDI-TOF-идентификации для грамотрицательных микробов является более высокой, чем для грампозитивных. Специального отбора образцов с грамотрицательными бактериями для наших экспериментов не проводилось.

По-видимому, главная причина негативных результатов идентификации микробов из смешанных культур связана не с принципиальными недостатками MALDI-TOF-масс-спектрометрии, а с несовершенством программного обеспечения существующих масс-спектрометров. Разработка методов идентификации микробов в микст-культурах требует создания колоссальных программных библиотек и совершенствования программ для обработки результатов. Однако в настоящее время реальность такова, что значительное количество ошибочных результатов, полученных при анализе полимикробных гемокультур, существенно ограничивает применение MALDI-TOF-метода в диагностике септических состояний.

Результаты работы показали перспективность применения масс-спектрометрической идентификации возбудителя в мономикробной гемокультуре. Однако использование данного метода не может рассматриваться как абсолютная альтернатива общепринятым способам идентификации возбудителя. Масс-спектрометрия может быть оправдана в качестве дополнительного исследования, позволяющего сократить время идентификации на 24–48 ч и, следовательно, ускорить применение адекватных антимикробных препаратов с учетом природной (видовой) резистентности возбудителя. Ускорение постановки диагноза при септических состояниях является жизненно важным: за каждый час промедления в назначении адекватной антибиотикотерапии выживаемость пациентов снижается примерно на 8% [14]. Поэтому необходимо использовать любую возможность ускорения постановки микробиологического диагноза.

Заключение. Результаты, полученные при помощи масс-спектрометрического MALDI-TOF-метода идентификации микроорганизмов в гемокультурах от детей с инфекциями кровотока, содержащих один микроб-возбудитель, имеют высокую степень соответствия результатам классического микробиологического исследования. MALDI-TOF-масс-спектрометрическая идентификация возбудителей инфекций кровотока может быть рекомендована в качестве дополнительного метода диагностики, направленного на сокращение времени анализа.

Финансирование исследования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение №14.607.21.0064, уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60714X0064).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература

1. Silva E., Passos R.H.D., Ferri M.B., de Figueiredo L.F.P. Sepsis: from bench to bedside. *Clinics* 2008; 63(1): 109–120, <http://dx.doi.org/10.1590/s1807-59322008000100019>.
2. Mayr F.B., Yende S., Angus D.C. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 2014; 5(1): 4–11, <http://dx.doi.org/10.4161/viru.27372>.
3. Angus D.C., Linde-Zwirble W.T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J., Pinsky M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29(7): 1303–1310, <http://dx.doi.org/10.1097/00003246-200107000-00002>.
4. Багирова Н.С. Современное состояние диагностики бактериемии. Сопроводительная терапия в онкологии 2006; 3: 23–38.
5. Чеботкевич В.Н., Кайтанджан Е.И., Бурылев В.В., Щетинкина Е.Е. Современные методы лабораторной диагностики сепсиса. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2013; 15(4): 295–300.
6. Jordana-Lluch E., Giménez M., Quesada MD, Ausina V., Martró E. Improving the diagnosis of bloodstream infections: PCR coupled with mass spectrometry. *Biomed Res Int* 2014; 2014: ID 501214, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/501214>.
7. Маянский Н.А., Калакуцкая А.Н., Мотузова О.В., Ломинадзе Г.Г., Крыжановская О.А., Катосова Л.К. MALDI-TOF масс-спектрометрия в рутинной работе микробиологической лаборатории. *Вопросы диагностики в педиатрии* 2011; 3(5): 20–25.
8. Tadros M., Petrich A. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and Sepsityper Kit™ for the direct identification of organisms from sterile body fluids in a Canadian Pediatric Hospital. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2013; 24(4): 191–194.
9. Tsai M.H., Chu S.M., Hsu J.F., Lien R., Huang H.R., Chiang M.C., Fu R.H., Lee C.W., Huang Y.C. Polymicrobial bloodstream infection in neonates: microbiology, clinical characteristics, and risk factors. *PLoS One* 2014; 9(1): e83082, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083082>.
10. Gray T.J., Thomas L., Olma T., Iredell J.R., Chen S.C. Rapid identification of Gram-negative organisms from blood culture bottles using a modified extraction method and MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77(2): 110–112, <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.016>.
11. Крыжановская О.А., Лазарева А.В., Пономаренко О.А., Катосова Л.К., Тепаев Р.Ф., Карасева О.В., Чеботарь И.В. Масс-спектрометрическая идентификация возбудителей инфекций кровотока: опыт в педиатрической практике. *Российский педиатрический журнал* 2014; 17(5): 4–9.
12. Fleiss J.L., Levin B., Paik M.C. Statistical methods for rates and proportions. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2003, <http://dx.doi.org/10.1002/0471445428>.
13. Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р., Бурменская О.В., Непша О.С., Никитина И.В., Любасовская Л.А., Ионов О.В.,

Ильина Е.Н., Трофимов Д.Ю., Митрохин С.Д. Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2014; 16(1): 4–9.

14. La Scola B. Intact cell MALDI-TOF mass spectrometry-based approaches for the diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev Mol Diagn* 2011; 11(3): 287–298.

References

1. Silva E., Passos R.H.D., Ferri M.B., de Figueiredo L.F.P. Sepsis: from bench to bedside. *Clinics* 2008; 63(1): 109–120, <http://dx.doi.org/10.1590/s1807-59322008000100019>.

2. Mayr F.B., Yende S., Angus D.C. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 2014; 5(1): 4–11, <http://dx.doi.org/10.4161/viru.27372>.

3. Angus D.C., Linde-Zwirble W.T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J., Pinsky M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29(7): 1303–1310, <http://dx.doi.org/10.1097/00003246-200107000-00002>.

4. Bagirova N.S. Current state of bacteremia diagnostics. *Soprovoditel'naya terapiya v onkologii* 2006; 3: 23–38.

5. Chebotkevich V.N., Kaytandzhan E.I., Burylev V.V., Shchetinkina E.E. Modern laboratory diagnostic techniques of sepsis. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2013; 15(4): 295–300.

6. Jordana-Lluch E., Giménez M., Quesada MD, Ausina V., Martró E. Improving the diagnosis of bloodstream infections: PCR coupled with mass spectrometry. *Biomed Res Int* 2014; 2014: ID 501214, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/501214>.

7. Mayanskiy N.A., Kalakutskaya A.N., Motuzova O.V., Lominadze G.G., Kryzhanovskaya O.A., Katosova L.K. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical microbiology

laboratory everyday work. *Voprosy diagnostiki v pediatrii* 2011; 3(5): 20–25.

8. Tadros M., Petrich A. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and Sepsityper Kit™ for the direct identification of organisms from sterile body fluids in a Canadian Pediatric Hospital. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2013; 24(4): 191–194.

9. Tsai M.H., Chu S.M., Hsu J.F., Lien R., Huang H.R., Chiang M.C., Fu R.H., Lee C.W., Huang Y.C. Polymicrobial bloodstream infection in neonates: microbiology, clinical characteristics, and risk factors. *PLoS One* 2014; 9(1): e83082, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083082>.

10. Gray T.J., Thomas L., Olma T., Iredell J.R., Chen S.C. Rapid identification of Gram-negative organisms from blood culture bottles using a modified extraction method and MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77(2): 110–112, <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.016>.

11. Kryzhanovskaya O.A., Lazareva A.V., Ponomarenko O.A., Katosova L.K., Tepaev R.F., Karaseva O.V., Chebotar I.V. Mass spectrometric identification of causative pathogens of bloodstream infections: experience in pediatric practice. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal* 2014; 17(5): 4–9.

12. Fleiss J.L., Levin B., Paik M.C. *Statistical methods for rates and proportions*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2003, <http://dx.doi.org/10.1002/0471445428>.

13. Pripitnevich T.V., Melkumyan A.R., Burmenskaya O.V., Nepsha O.S., Nikitina I.V., Lyubasovskaya L.A., Ionov O.V., Ilyina E.N., Trofimov D.Yu., Mitrokhin S.D. Use of MALDI-TOF mass spectrometry and quantitative PCR for rapid diagnosis of sepsis. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2014; 16(1): 4–9.

14. La Scola B. Intact cell MALDI-TOF mass spectrometry-based approaches for the diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev Mol Diagn* 2011; 11(3): 287–298.