Laboratorinė medicina.
2019, t. 21, Nr. 1(81), p. 13–19.

Mikroorganizmų identifikavimo tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės masių spektrometrijos būdu ir mikrobiologinio pasėlio metodu rezultatų palyginimas

Žiedė Daubarienė[1]
Gabrielė Samuolytė[2]
Astra Vitkauskienė[1]

Santrauka

Darbo tikslas. Įvertinti mikroorganizmų identifikavimo tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės masių spektrometrijos būdu ir mikrobiologinio pasėlio metodu rezultatus.

Tyrimo medžiaga ir metodai. Tyrimui atrinkti tik teigiami kraujo pasėlio mėginiai. Mikroorganizmų identifikavimas kraujo pasėlio mikrobiologinio tyrimo metu buvo lyginamas su mikroorganizmų identifikavimu tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu. Tiesioginiam mikroorganizmų identifikavimui buvo naudojamas ekstrakcijos skruzdžių rūgštimi metodas. Statistinė analizė atlikta naudojant SPSS 20 programinį paketą, rezultatai laikomi statistiškai reikšmingais, kai $p<0,05$.

Tyrimo rezultatai. Ištirti 102 teigiami kraujo pasėlio mėginiai. 10,8 % teigiamų kraujo pasėlių buvo polimikrobiniai, 89,2 % – monomikrobiniai. Nustatyta, kad 89,2 % atvejų, identifikuojant mikroorganizmus iki rūšies MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu kraujo mikrobiologinio tyrimo metu ir tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės, rezultatai sutapo, o 10,8 % atvejų rezultatai tarp šių metodų nesutapo, tačiau pastebėta, kad šį nesutapimą lėmė polimikrobinės bakteriemijos atvejai. Identifikuojant mikroorganizmus MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu kraujo mikrobiologinio tyrimo metu, kraujo infekcijos sukėlėjų gali būti nustatoma vienas ir daugiau, o atliekant tiesioginį identifikavimą iš teigiamo kraujo pasėlio iki rūšies nustatomas tik vienas sukėlėjas, tačiau taikant šį metodą mikroorganizmų identifikavimo laikas po BACTEC^{TM} FX pranešimo apie teigiamą kraujo pasėlio mėginį sutrumpėjo iki <4 val.

Išvados. Atliekant tiesioginį mikroorganizmų identifikavimą iš teigiamos kraujo pasėlio terpės naudojant MALDI-TOF masių spektrometrijos metodą, greičiau aptinkami mikroorganizmai, tačiau dalis patogenų nėra identifikuojami esant polimikrobinei infekcijai, todėl šis metodas dar negali pakeisti rutininio mikrobiologinio pasėlio metodo.

Reikšminiai žodžiai: MALDI-TOF MS, tiesioginis identifikavimas, kraujo infekcija, bakterijos.

[1]*Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos fakulteto Laboratorinės medicinos klinika*
Lithuanian University of Health Sciences, Faculty of Medicine, Clinic of Laboratory Medicine
El. paštas: ziede.garbenyte@gmail.com

[2]*Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos fakultetas*
Lithuanian University of Health Sciences, Faculty of Medicine

ĮVADAS

Sepsis – žalingas sisteminis šeimininko atsakas į infekciją, sukeliantis visų organų sistemų pažeidimą [1]. Kraujo infekcijos yra pagrindinė sepsio priežastis, kuri kasmet Europoje paveikia apie 1,2 mln. žmonių [2]. Kraujo infekcijų patvirtinimas ir gydymas priklauso nuo kraujo pasėlio rezultatų. Kraujo pasėlis apibūdinamas kaip aukso vertės standartas aptinkant ir identifikuojant mikroorganizmus, sukeliančius kraujo infekciją [3]. Ankstyvas infekcijos sukėlėjų atpažinimas yra raktas į veiksmingą sepsio gydymą [4]. A. Kumar su bendraautoriais [5, 6] nustatė, kad pirmosios 24 valandos yra svarbiausios siekiant efektyvaus antimikrobinio gydymo. Kiekviena uždelsta valanda pradėti tikslingą gydymą antibiotikais praėjus 6 valandoms nuo infekcijos pradžios yra susijusi su 7,6 % sumažėjusiu išgyvenamumu, o netinkamų antibiotikų vartojimas – su maždaug penkis kartus mažesniu išgyvenamumu. Dėl to gydytojai pacientams, kuriems įtariama bakterinė infekcija, iš pradžių empiriškai paskiria plataus spektro antibiotikus. Tačiau dėl padidėjusio mikroorganizmų atsparumo antibiotikams dažnio apie 20 % sepsinio šoko pacientų iš pradžių paskiriamas netinkamas gydymas antibiotikais, dėl to didėja mirštamumas [6, 7]. Taigi technologijos, kurios sutrumpintų kraujo infekcijos sukėlėjo nustatymo laiką, yra gyvybiškai svarbios šių pacientų mirštamumui mažinti.

Lazerinės desorbcinės jonizacijos masių spektrometrija (angl. *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF MS) rutiniškai naudojama bakterijų ir grybelių identifikavimui iš izoliuotų kolonijų daugelyje Europos sveikatos centrų, vis dažniau Šiaurės Amerikoje bei kitur [8–10]. Ši technologija sukuria būdingus masių spektrus, kurie yra unikalūs kiekvienam mikroorganizmui [11]. Palyginti su standartiniu fenotipiniu identifikavimu, ši technologija yra greita, nebrangi (po pradinio prietaiso įsigijimo) ir gali identifikuoti ant kietųjų mitybos terpių išaugusias mikroorganizmų kolonijas iki rūšies [12, 13]. Tačiau naudojant šį metodą išauginti mikroorganizmus ant kietųjų terpių vidutiniškai užtrunka papildomas 18–24 val. po automatizuotos kraujo pasėlio sistemos signalo apie teigiamą kraujo pasėlio mėginį [14].

Naujausi tyrimai aprašo sėkmingą ir greitą mikroorganizmų rūšių identifikaciją tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės naudojant MALDI-TOF masių spektrometriją [15–17]. Šiai tiesioginei identifikacijai nebereikalingas mikroorganizmų auginimo ant kietųjų mitybos terpių etapas. Pažymėtina, kad dėl greitesnių mikroorganizmų identifikavimo technologijų labai sutrumpėja kraujo infekcijos sukėlėjo identifikavimui reikalingas laikas, gali būti optimizuojamas ankstyvas tinkamų antimikrobinių medžiagų vartojimas, kartu sumažinant buvimo ligoninėje laiką ir su tuo susijusias išlaidas [18, 19].

Didėjantis kraujo infekcijos sukėlėjų atsparumas antibiotikams dėl empirinio jų vartojimo bei pacientų mirštamumas dėl neveiksmingo gydymo yra aktuali medicinos, ekonominė ir socialinė problema. Siekiant sutrumpinti mikroorganizmų identifikavimo laiką, kad būtų kuo greičiau atlikta reikalinga antibiotikograma, paskirtas tikslingas gydymas antibiotikais ir sumažintos atsparių mikroorganizmų atsiradimo ir plitimo galimybės, atliktas tyrimas, įvertinantis MALDI-TOF masių spektrometrijos efektyvumą identifikuojant mikroorganizmus tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės.

DARBO TIKSLAS

Mūsų darbo tikslas buvo įvertinti mikroorganizmų identifikavimo tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės masių spektrometrijos būdu ir mikrobiologinio pasėlio metodu rezultatus.

TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Tyrimas atliktas LSMU ligoninės Kauno klinikų Laboratorinės medicinos klinikoje. Tyrimui atrinkti tik teigiami kraujo pasėlio mėginiai, t. y. tie, kuriuose naudojant automatizuotą kraujo pasėlio sistemą BACTEC™ FX (BD Diagnostic Systems, JAV) aptinkamas mikroorganizmų augimas.

Tiriamoji medžiaga inokuliuojama į BACTEC mėgintuvėlius, kurie įstatomi į BACTEC™ FX automatinį termostatą inkubuoti ir periodiškai analizuoti. Kiekviename mėgintuvėlyje yra cheminis jutiklis, kuris nustato didėjantį CO_2, išskiriamą augančių mikroorganizmų. Prietaisas kas dešimt minučių tikrina jutiklį pagal fluorescencijos, proporcingos esamo CO_2 kiekiui, intensyvumo didėjimą. Padidėjusio CO_2 santykio ir kiekio tyrimas leidžia BACTEC rūšies fluorescencinės serijos prietaisu nustatyti, ar tiriamosios medžiagos rezultatas yra teigiamas, t. y. ar tyrimo mėginyje yra gyvybingų mikroorganizmų. Nustatomi tik mikroorganizmai, augantys konkrečioje terpėje.

BACTEC™ FX aparatui davus garsinį signalą apie teigiamą pasėlį, toliau kraujo pasėlio mėginys tiriamas dviem metodais. Pirmasis – mikroorganizmų identifikavimas iki rūšies MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu, atliekant kraujo pasėlio mikrobiologinį tyrimą. Šiuo metodu mėginys mikroskopuojamas, nustatomas mikroorganizmų buvimas, jų judrumas, dažoma Gramo būdu, iš to matyti mikroorganizmų dažymosi pobūdis, forma. Pagal mikroskopijos rezultatus mikroorganizmai išsėjami ant kietųjų mitybos terpių, nuo kurių išaugusi mikroorganizmų kolonija perkeliama ant MALDI identifikavimo plokštelės, kuri įdedama į MALDI-TOF masių spektrometrą. Antrasis metodas – mikroorganizmų identifikavimas iki rūšies MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės. Šio tyrimo metodo paskirtis – identifikuoti iš teigiamo kraujo pasėlio, kultivuojamo HB&L terpėje (iki 1 ± 0,25 McF (McFarland), augančius mikroorganizmus iki rūšies, naudojant kultūrą iš susidariusių po centrifugavimo nuosėdų. Mikroorganizmų nuosėdos paveikiamos skruzdžių rūgštimi ir perkeliamos ant MALDI identifikavimo plokštelės, kuri įdedama į MALDI-TOF masių spektrometrą.

Tyrimo duomenys buvo analizuojami naudojant statistinio duomenų apdorojimo paketo SSPS (*Statistical Package for Social Sciences*) 20 versiją. Tyrimo rezultatų analizei buvo pasitelkti aprašomosios statistikos metodai, bendrieji skirstiniai, dažnių lentelės. Kokybiniams duomenims vertinti naudotas chi kvadrato (^{2}) kriterijus. Rezultatai laikomi statistiškai reikšmingais, kai $p<0,05$.

TYRIMO REZULTATAI

Tyrimo metu iš viso buvo vertinami 102 teigiami kraujo pasėlio mėginiai, užfiksuoti automatizuotoje kraujo pasėlio sistemoje BACTEC™ FX.

Laiko trukmė nuo patekimo į laboratoriją iki automatizuotos kraujo pasėlio sistemos BACTEC™ FX pranešimo apie teigiamą kraujo pasėlio mėginį svyravo nuo 2 val. iki 92 val. Todėl teigiami mėginiai buvo suskirstyti į tris laiko intervalus. Vertinant laiko trukmę nustatyta, kad daugumai

kraujo pasėlio mėginių pranešimas apie aptiktus gyvybingus mikroorganizmus patikimai dažniau pasirodydavo per mažiau nei 24 valandas ($p<0,05$). Penkiolikai iš 102 kraujo pasėlio mėginių prireikė daugiau nei 24 valandų BACTEC™ FX sistemos teigiamam signalui gauti (1 lentelė).

Kraujo pasėlyje identifikuoti mikroorganizmai priklausė 26 skirtingoms bakterijų rūšims, 2 mikroorganizmai identifikuoti tik iki genties. *Enterobacterales* šeima: *Escherichia coli; Klebsiella pneumoniae; Klebsiella oxytoca; Salmonella enteritidis; Serratia marcescens; Citrobacter freundii; Citrobacter braakii; Proteus mirabilis; Enterobacter kobei; Enterobacter aerogenes*. ir hemoliziniai streptokokai: *Streptococcus anginosus; Streptococcus salivarius; Streptococcus agalactiae; Streptococcus constellatus; Streptococcus oralis; Streptococcus pneumoniae, Streptococcus mitis; Streptococcus mutans*. Plazmos nekoaguliuojantys stafilokokai: *Staphylococcus succinus; Staphylococcus epidermidis*. Enterokokai (*Enterococcus* spp.): *Enterococcus faecium; Enterococcus faecalis*. Nefermentuojančios bakterijos: *Acinetobacter* spp.; *Acinetobacter baumannii; Pseudomonas aeruginosa*. Kiti: *Moraxella catarrhalis; Corynebacterium urealyticum; Bacteroides* spp.

Išskyrus ir identifikavus iki rūšies bakterijas MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu atliekant kraujo pasėlio mikrobiologinį tyrimą gauta, kad *Enterobacterales* šeimai priklausančios bakterijos vyravo patikimai dažniau palyginti su kitų bakterijų grupėmis ($p<0,05$). Enterokokai, nefermentuojančios bakterijos bei ir hemoliziniai streptokokai buvo identifikuoti apie 5 kartus rečiau nei *Enterobacterales* šeima. Plazmos nekoaguliuojantys stafilokokai nustatyti dviejuose mėginiuose, o kiti sukėlėjai – trijuose mėginiuose. Bakterijų rūšių pasiskirstymas pateikiamas 1 paveiksle.

Iš 102 teigiamų kraujo pasėlių 11-a buvo polimikrobiniai, tai reiškia, kad mėginyje buvo dvi ir daugiau kraujo infekcijos sukėlėjų rūšys, kiti kraujo pasėlio mėginiai – monomikrobiniai – juose nustatyta viena sukėlėjo rūšis.

Identifikuojant kraujo infekciją sukeliančias bakterijas iš teigiamos kraujo pasėlio terpės mikrobiologinio pasėlio metodu masių spektrometrijos būdu patikimai dažniau (n=91) išskirtas vienos rūšies sukėlėjas ($p<0,05$). Du sukėlėjai išskirti iš 10 teigiamų kraujo pasėlio mėginių. Tik

1 lentelė. **Laiko trukmė iki automatizuotos kraujo pasėlio sistemos BACTEC™ FX signalo apie teigiamą kraujo pasėlio mėginį**
Table 1. **Duration of time until automated blood culture system BACTEC™ FX gives a signal of a positive blood culture sample**

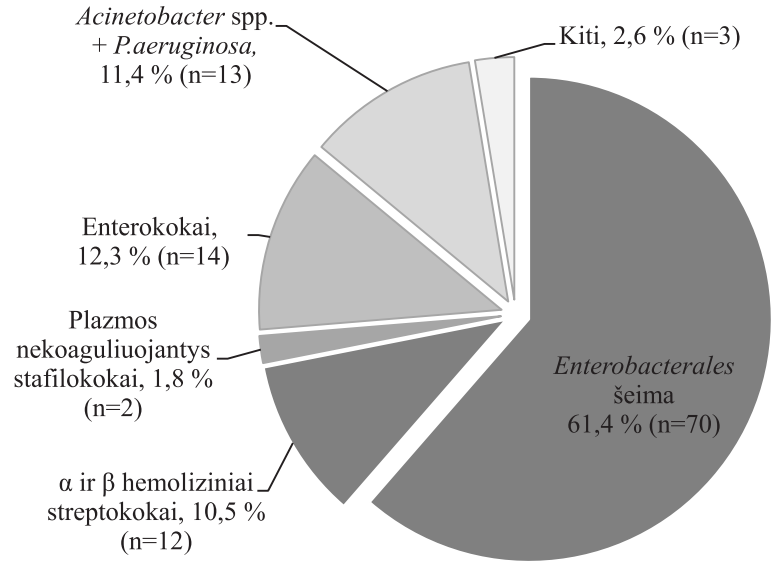
Laiko intervalas, val.	Teigiamų kraujo pasėlio mėginių skaičius, %
10	41,2*
11–24	44,1*
> 24	14,7**

* lyginant su **, $p<0,05$.

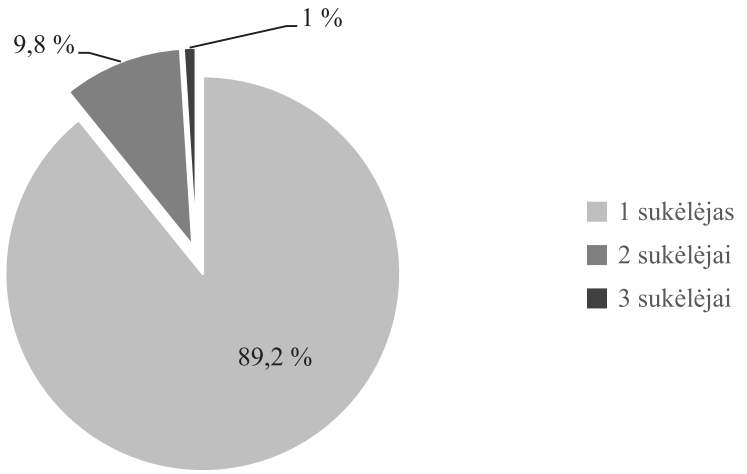
viename teigiamame kraujo pasėlio mėginyje identifikuoti trys skirtingos rūšies kraujo infekcijos sukėlėjai (2 pav.).

Atlikus bakterijų identifikavimą iki rūšies tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu, visais atvejais (100 %) buvo identifikuotas vienos rūšies kraujo infekcijos sukėlėjas.

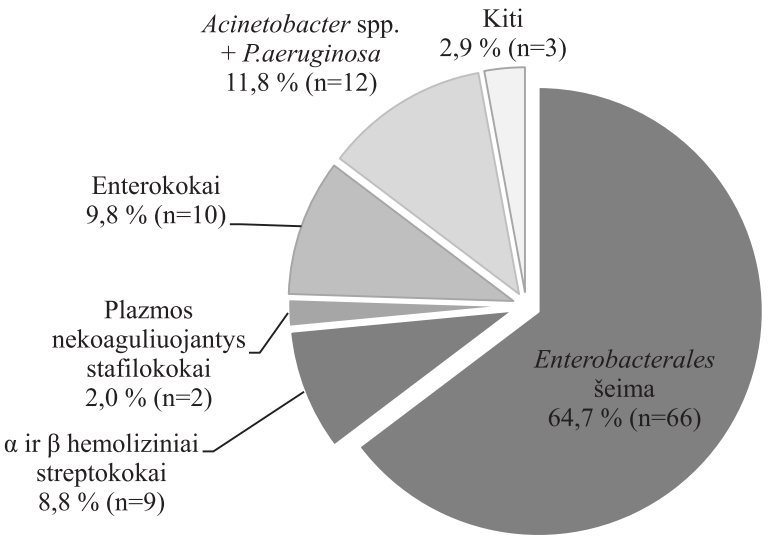
Nustatyta, kad *Enterobacterales* šeima sudarė didžiausią dalį visų identifikuotų kraujo infekcijos sukėlėjų. Nefermentuojančių bakterijų grupė buvo identifikuojama 5,5 karto rečiau, enterokokai bei ir hemoliziniai streptokokai buvo identifikuojami atitinkamai 6,6 ir 7,4 karto rečiau nei *Enterobacterales* šeima. Plazmos nekoaguliuojantys stafilokokai buvo nustatyti dviejuose mėginiuose, o kiti su-



1 pav. **Bakterijų procentinis pasiskirstymas identifikavus iki rūšies MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu atliekant kraujo pasėlio mikrobiologinį tyrimą**
Fig. 1. **Distribution of bacteria identified by MALDI-TOF mass spectrometry by conventional microbiological method**



2 pav. **Išskirtų kraujo infekcijos sukėlėjų rūšių skaičius (%) viename mėginyje**
Fig. 2. **Number of isolated types of bloodstream infection pathogens (%) in one sample**



3 pav. **Bakterijų procentinis pasiskirstymas identifikuojant iki rūšies MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės**
Fig. 3. **Distribution of bacteria identified directly from positive blood culture medium by MALDI-TOF mass spectrometry**

kėlėjai – trijuose mėginiuose. Bakterijų rūšių pasiskirstymas pateikiamas 3 paveiksle.

Tyrimo metu nustatyta, kad 89,2 % atvejų, identifikuojant bakterijas iki rūšies MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu kraujo mikrobiologinio tyrimo metu ir tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės, rezultatai sutapo. 10,8 % atvejų rezultatai tarp šių metodų nesutapo, tačiau pastebėta, kad šį nesutapimą lėmė polimikrobinės bakteriemijos atvejai. Bakterijų identifikavimo skirtumai polimikrobinės bakteriemijos atveju pateikti 2 lentelėje.

Analizuojant tyrimo metu gautus duomenis pastebėta, kad polimikrobiniuose kraujo pasėlio mėginiuose nustatytas mikroorganizmas, tiriant tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės, 7 atvejais iš 11 priklausė *Enterobacterales* šeimai (63,6 %), *Streptococcus* spp. genčiai priklausė 18,2 % atvejų, o *Staphylococcus* spp. ir *Pseudomonas* spp. gentims – po 9,1 % atvejų.

Pastebėta, kad tuose pačiuose polimikrobiniuose kraujo pasėliuose, tiriant tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės, nė vienu atveju nebuvo aptikta *Enterococcus* spp. genties bakterijų.

Vertinant abiejų tyrime naudotų metodų privalumus ir trūkumus, pagrindiniai lyginamieji aspektai būtų identifikuojamų sukėlėjų skaičius bei laikas, per kurį identifikuojamas kraujo infekcijos sukėlėjas. Identifikuojant bakterijas MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu, atlikus kraujo pasėlio mikrobiologinį tyrimą, sukėlėjų gali būti nustatoma vienas ir daugiau, tačiau, atliekant tiesioginę identifikaciją iki rūšies iš teigiamos kraujo pasėlio terpės, nustatomas tik vienas sukėlėjas. Bakterijų identifikavimo laikas po automatizuotos kraujo pasėlio sistemos BACTEC™ FX pranešimo apie teigiamą kraujo pasėlio mėginį labai skiriasi: identifikuojant mikroorganizmus MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu kraujo mikrobiologinio tyrimo metu, išauginti mikroorganizmus ant kietųjų mitybos terpių užtrunka nuo 18 val. iki 24 val. Be to, mikroorganizmams augti reikalingos skirtingos kietųjų mitybos terpių rūšys. Atliekant tiesioginį identifikavimą iki rūšies iš teigiamos kraujo pasėlio terpės MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu, procesas mūsų atliktame tyrime užtruko nuo 55 min. iki 4 val., t. y. tol, kol mikroorganizmai HB&L terpėje pagausinami iki 1 ± 0,25 McF (3 lentelė).

2 lentelė. **Bakterijų identifikavimo palyginimas polimikrobinės bakteriemijos atveju**
Table 2. **Comparison of the identification of bacteria in case of polymicrobial bacteremia**

Bakterijų identifikavimas iki rūšies MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu, atlikus kraujo pasėlio mikrobiologinį tyrimą	**Bakterijų identifikavimas iki rūšies MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės**
Klebsiella pneumoniae, Citrobacter braakii ir *Enterococcus faecium*	*Klebsiella pneumoniae*
Klebsiella pneumoniae ir *Escherichia coli*	*Klebsiella pneumoniae*
Pseudomonas aeruginosa ir *Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*
Escherichia coli ir *Proteus mirabilis*	*Escherichia coli*
Streptococcus salivarius ir *Streptococcus oralis*	*Streptococcus salivarius*
Streptococcus constellatus ir *Streptococcus mitis*	*Streptococcus constellatus*
Staphylococcus epidermidis ir *Streptococcus mutans*	*Staphylococcus epidermidis*
Proteus mirabilis ir *Enterococcus faecalis*	*Proteus mirabilis*
Escherichia coli ir *Enterococcus faecalis*	*Escherichia coli*
Klebsiella oxytoca ir *Enterococcus faecium*	*Klebsiella oxytoca*
Klebsiella pneumoniae ir *Acinetobacter baumannii*	*Klebsiella pneumoniae*

3 lentelė. **Bakterijų identifikavimo palyginimas tarp metodų**
Table 3. **Comparison of the identification of bacteria between methods**

	Bakterijų identifikavimas iki rūšies MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu, atlikus kraujo pasėlio mikrobiologinį tyrimą	**Bakterijų identifikavimas iki rūšies MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės**
Identifikuojamas kraujo infekcijos sukėlėjų rūšių skaičius viename mėginyje	1 rūšies sukėlėjai	1 rūšies sukėlėjai
Bakterijų identifikavimo laikas po automatizuotos kraujo pasėlio sistemos BACTEC™ FX pranešimo apie teigiamą kraujo pasėlio mėginį	18–24 val.	<4 val.

REZULTATŲ APTARIMAS IR DISKUSIJA

Įprastai mikroorganizmų identifikavimas naudojant MALDI-TOF masių spektrometriją yra atliekamas iš mikroorganizmų kolonijų po 18–48 val. jų inkubacijos ant kietųjų mitybos terpių. Per pastaruosius keletą metų atsirado mokslinių tyrimų, susijusių su tiesioginiu mikroorganizmų identifikavimu iš kraujo kultūros naudojant masių spektrometriją [20–22]. Todėl šiame darbe mes siekėme išsiaiškinti, ar mikroorganizmų identifikavimo tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės rezultatai sutampa su plačiai pasaulyje naudojamo mikroorganizmų identifikavimo iš izoliuotų kolonijų masių spektrometrijos būdu rezultatais.

Mūsų tyrime tiesioginiam mikroorganizmų identifikavimui buvo naudojamas ekstrakcijos skruzdžių rūgštimi metodas, kuriuo teisingai identifikuota 89,2 % mikroorganizmų. Mūsų gautus duomenis patvirtino ir mokslininkų M. Christner et al. [23] ir W. Moussaoui et al. [24] tyrimas, kuris parodė, kad tiesioginiu mikroorganizmų nustatymo metodu teisingai identifikuota 89,66 % kraujo infekcijos sukėlėjų, įskaitant polimikrobinės bakteriemijos atvejus, o vien monomikrobiniai kraujo pasėliai iki rūšies teisingai identifikuoti 95,22 % atvejų. P. R. Lagace-Wiens su bendraautoriais [25] tiesioginiu mikroorganizmų nustatymo metodu teisingai identifikavo 85,2 % kraujo infekcijos sukėlėjų monomikrobiniame kraujo pasėlyje. Vertinant šiame darbe tirtus monomikrobinius kraujo pasėlius gauta, kad 100 % atvejų tiesioginė mikroorganizmų identifikacija iš teigiamos kraujo pasėlio terpės sutapo su mikroorganizmų identifikacija iš kolonijos, atlikus mikrobiologinį tyrimą. A. Egli et al. [15] teigė, kad sėkmingo identifikavimo rodiklis gali būti kintamas dėl skirtingų kraujo pasėlio sistemų, inkubavimo atmosferos bei kraujo mėginių ruošimo metodikos.

Vertinant identifikuotų bakterijų rūšinį pasiskirstymą po identifikavimo abiem metodais, vyraujančios bakterijos kraujo pasėliuose priklausė *Enterobacterales* šeimai. Belgijos mokslininkų studijoje gramneigiamos lazdelės sudarė daugiau kaip pusę (54,5 %) mikroorganizmų, identifikuotų iš teigiamos kraujo pasėlio terpės [22]. Taivano mokslininkų duomenimis, *Enterobacterales* šeima identifikuota 49,69 % atvejų, Kinijos – 45,42 % atvejų [14, 26].

C. Meex su bendraautoriais [27] pastebėjo, kad nepriklausomai, koks ekstrakcijos metodas naudojamas, tiesioginis gramteigiamų bakterijų nustatymas visada yra prastesnis nei gramneigiamų bakterijų, o priežastis iki šiol tiksliai nežinoma. Tai patvirtina daugelis kitų autorių [14, 20, 22, 26, 28–31], kurie nustatė, kad gramneigiamų mikroorganizmų identifikavimas jų studijose yra kur kas sėkmingesnis nei gramteigiamų, ypač *Enterobacterales* šeimos [14] bei nefermentuojančių bakterijų *Pseudomonas aeruginosa* ir *Acinetobacter baumannii* [32]. Tai galėtų paaiškinti mūsų tyrimo duomenyse pastebėtą tendenciją, kad polimikrobiniuose mėginiuose, kuriuose buvo ir gramteigiamų, ir gramneigiamų bakterijų rūšių, tiesioginės mikroorganizmų identifikacijos metu visais atvejais buvo nustatyta gramneigiamos bakterijos rūšis, be to, nė vienu atveju nebuvo aptikta *Enterococcus* spp. genties mikroorganizmų.

Mūsų tyrimo duomenys nesiskyrė nuo kitų autorių gautų rezultatų – atlikus mikroorganizmų identifikavimą iki rūšies tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės, naudojant MALDI-TOF masių spektrometriją, visais atvejais, įskaitant ir polimikrobinę bakteriemiją, buvo identifikuotas tik vienos rūšies kraujo infekcijos sukėlėjas [20, 29, 30].

Mes nustatėme, kad daugumai (85,3 %) kraujo pasėlio mėginių pranešimas apie aptiktus gyvybingus mikroorganizmus patikimai dažniau pasirodydavo per mažiau nei 24 valandas ($p<0,05$). Mūsų rezultatus patvirtina ir J. F. Lin su bendraautoriais [14], kurie nustatė, kad BACTEC™ FX signalas apie teigiamą kraujo pasėlio mėginį vidutiniškai pasirodo po 17,1 valandos.

Mūsų tyrimo duomenimis, mikroorganizmų identifikavimo laikas po automatizuotos kraujo pasėlio sistemos BACTEC™ FX pranešimo apie teigiamą kraujo pasėlio mėginį, taikant tiesioginį identifikacijos metodą iš teigiamos kraujo pasėlio terpės, vidutiniškai užtruko 2 val. 5 min. Kitų šalių autorių duomenys išsiskiria – W. Moussaoui et al. [24] ir B. La Scola et al. [33] kraujo infekcijos sukėlėjus tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės identifikavo per 2–3 val., tačiau A. G. W. Foster [34] pateikė galimybę nustatyti mikroorganizmus per 30–45 min.

Lygindami bakterijų identifikavimo laiką naudojant MALDI-TOF masių spektrometriją atlikus kraujo pasėlio mikrobiologinį tyrimą ir tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės, nustatėme, kad infekcijos sukėlėjo nustatymo laikas sutrumpėjo 14–20 valandų. Turint omenyje lėtą anaerobinių mikroorganizmų augimą ant kietųjų mitybos terpių, jų identifikavimo laikas galėtų sutrumpėti dar labiau.

Apibendrinant šiame tyrime gautus rezultatus galima teigti, kad tiesioginis masių spektrometrijos metodas iš teigiamos kraujo pasėlio terpės su skruzdžių rūgšties ekstrakcijos etapu užtikrina patikimus mikroorganizmų identifikavimo rezultatus. Mūsų rezultatus patvirtina ir kitų autorių atlikti panašūs tyrimai [14, 35, 36]. Metodui nereikia didelių sąnaudų, jis yra lengvai įgyvendinamas atliekant įprastus laboratorinius tyrimus [37]. Svarbiausia, kad greitas ir keliolika valandų ankstyvesnis mikroorganizmų identifikavimas tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės leidžia atlikti išankstinę antibiotikogramą, anksčiau parinkti tinkamą gydymą bei sumažinti nereikalingą antibiotikų vartojimą. Vis dėlto mikrobiologinio pasėlio metodas išlieka kaip patvirtinamasis ir būtinas.

IŠVADOS

Atlikus įprastą kraujo pasėlio mikrobiologinį tyrimą, galima nustatyti ne tik monomikrobinę, bet ir polimikrobinę infekciją. Tiesiogiai iš teigiamos kraujo pasėlio terpės, neatlikus įprasto mikrobiologinio pasėlio, galima nustatyti daugumą patogeninių mikroorganizmų naudojant MALDI-TOF masių spektrometriją. Nors atliekant tiesioginį mikroorganizmų identifikavimą iš teigiamos kraujo pasėlio terpės naudojant MALDI-TOF masių spektrometrijos metodą greičiau aptinkami mikroorganizmai, tačiau dalis patogenų nėra identifikuojami esant polimikrobinei infekcijai, todėl šis metodas dar negali pakeisti rutininio mikrobiologinio pasėlio metodo. ◆

Gauta: 2019 02 21
Priimta spaudai: 2019 03 28

Summary

COMPARISON OF MASS SPECTROMETRY METHOD DIRECTLY FROM POSITIVE BLOOD CULTURE MEDIUM AND CONVENTIONAL MICROBIOLOGICAL METHOD IN THE IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS

Žiedė Daubarienė, Gabrielė Samuolytė, Astra Vitkauskienė

Aim. To evaluate the results of the identification of microorganisms directly from positive blood culture medium by mass spectrometry and conventional microbiological method.

Methods and the study subjects. Study involved only positive blood cultures. Identification of microorganisms by conventional microbiological method was compared with identification of microorganisms directly from positive blood culture medium by the MALDI-TOF mass spectrometry. For direct identification of microorganisms, the method of extraction with formic acid was used. Statistical analysis was performed using SPSS 20 software package, the results were considered statistically significant when P value was less than 0.05.

Results. 102 positive blood cultures were tested. 10.8% of positive blood cultures were polymicrobial, 89.2% – monomicrobial. The study found that in 89.2% cases, the results between two methods coincided, but in 10.8% cases the results did not coincide. It was observed that this incompatibility was caused by cases of polymicrobial bacteremia.

Identifying microorganisms by conventional microbiological method, one or more infection agents can be detected and only one agent is detected by direct identification from positive blood culture. However, using this direct method, the time of identification of microorganisms was shortened to less than 4 h after the BACTEC^{TM} FX positive signal was detected.

Conclusions. The identification of microorganisms directly from positive blood culture samples by mass spectrometry takes less time, but some of the pathogens are not identified in the presence of a polymicrobial infection, so this method cannot currently replace the conventional microbiological method.

Keywords: MALDI-TOF MS, direct identification, blood infection, bacteria.

LITERATŪRA

1. Gaižauskas E, Judickas Š, Balčiūnas L, Ščupakova N, Mockutė L, Šerpytis M, et al. Sunkaus sepsio ir septinio šoko sukeltos organų sistemų disfunkcijos prevencija ir gydymas. (Prevention and treatment of severe sepsis and septic shock induced organ disfunction). Medicinos teorija ir praktika 2016; 1: 67–76.
2. Goto M, Al-Hasan MN. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. Clin Microbiol Infect 2013; 19: 501–9.
3. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. Crit Care Med 2013; 41: 580–637.
4. Gaieski DF, Mikkelsen ME, Band RA, Pines JM, Massone R, Furia FF, et al. Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department. Crit Care Med 2010; 38(4): 1045–53.
5. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. Chest 2009; 136(5): 1237–48.
6. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, 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(6): 1589–96.
7. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Land GA, et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. Arch Pathol Lab Med 2013; 137(9): 1247–54.
8. Bessede E, Angla-Gre M, Delagarde Y, Sep Hieng S, Menard A, Megraud F. Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: experience in the routine of a university hospital. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 533–8.
9. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2010; 48: 1549–54.
10. van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Microbiol 2010; 48: 900–7.
11. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev 2012; 36: 380–407.
12. Fothergill A, Kasinathan V, Hyman J, Walsh J, Drake T, et al. Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood-culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum analysis with the SARAMIS database. J Clin Microbiol 2013; 51: 805–9.
13. Patel R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. Clin Infect Dis 2013; 57: 564–72.
14. Lin JF, Ge MC, Liu TP, Chang SC, Lu JJ. A simple method for rapid microbial identification from positive monomicrobial blood culture bottles through matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. J Microbiol Immunol Infect 2018; 51: 659–65.
15. Egli A, Osthoff M, Goldenberger D, Halter J, Schaub S, Steiger J, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) directly from positive blood culture flasks allows rapid identification of bloodstream infections in immunosuppressed hosts. Transpl Infect Dis 2015; 17: 481–7.
16. Clerc O, Prod'hom G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with gram-negative bacteremia: a prospective observational study. Clin Infect Dis 2013; 56: 1101–7.
17. Dixon P, Davies P, Hollingworth W, Stoddart M, MacGowan A. A systematic review of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015; 34: 863–76.
18. Schneiderhan W, Grundt A, Wörner S, Findeisen P, Neumaier M. Work flow analysis of around-the-clock processing of blood culture samples and integrated MALDI-TOF mass spectrometry analysis for the diagnosis of bloodstream infections. Clin Chem 2013; 59(11): 1649–56.
19. Machen A, Drake T, Wang YF. Same day identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF VITEK mass spectrometry and the VITEK2 system. PLoS One 2014; 9(2): e87870.
20. Jakovljev A, Bergh K. Development of a rapid and simplified protocol for direct

bacterial identification from positive blood cultures by using matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. BMC Microbiol 2015; 15: 258.

21. Frederic S, Antoine M, Bodson A, Lissoir B. Bacterial rapid identification with matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: development of an 'in-house method' and comparison with Bruker Sepsityper(®) kit. Acta Clin Belg 2015; 70(5): 325–30.
22. Randazzo A, Simon M, Goffinet P, Classen JF, Hougardy N, Pierre P, et al. Optimal turnaround time for direct identification of microorganisms by mass spectrometry in blood culture. J Microbiol Methods 2016; 130: 1–5.
23. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. J Clin Microbiol 2010; 48(5): 1584–91.
24. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. Clin Microbiol Infect 2010; 16(11): 1631–8.
25. Lagace-Wiens PR, Adam HJ, Karlowsky JA, Nichol KA, Pang PF, Guenther J, et al. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. J Clin Microbiol 2012; 50(10): 3324–8.
26. Zhou M, Yang Q, Kudinha T, Sun L, Zhang R, Liu C, et al. An improved in-house MALDI-TOF MS protocol for direct cost-effective identification of pathogens from blood cultures. Front Microbiol 2017; 8: 1824.
27. Meex C, Neuville F, Descy J, Huynen P, Hayette MP, De Mol P, et al. Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction. J Med Microbiol 2012; 61(11): 1511–6.
28. Morgenthaler NG, Kostrzewa M. Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: review and meta-analysis of the performance of the Sepsityper kit. Int J Microbiol 2015; 2015: 827416.
29. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2010; 48(2): 444–7.
30. Buchan BW, Riebe KM, Ledeboer NA. Comparison of the MALDI Biotyper system using Sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. J Clin Microbiol 2012; 50(2): 346–52.
31. French K, Evans J, Tanner H, Gossain S, Hussain A. The clinical impact of rapid, direct MALDI-ToF identification of bacteria from positive blood cultures. PLoS One. 2016; 11(12): e0169332.
32. Riederer K, Cruz K, Shemes S, Szpunar S, Fishbain JT. MALDI TOF identification of Gram-negative bacteria directly from blood culture bottles containing charcoal: Sepsityper(R) kits versus centrifugation-filtration method. Diagn Microbiol Infect Dis 2015; 82: 105–8.
33. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. PLoS One 2009; 4(11): e8041.
34. Foster AGW. Rapid identification of microbes in positive blood cultures by use of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry system. J Clin Microbiol 2013; 51(11): 3717–9.
35. Bazzi AM, Rabaan AA, El Edaily Z, John S, Fawarah MM, Al-Tawfiq JA. Comparison among four proposed direct blood culture microbial identification methods using MALDI-TOF MS. J Infect Public Health 2017; 10(3): 308–15.
36. Barberino MG, Silva MO, Arraes ACP, Correia LC, Mendes AV. Direct identification from positive blood broth culture by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Braz J Infect Dis 2017; 21(3): 339–42.
37. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 1614–9.