

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202000149** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.12.31

(22) Дата подачи заявки
2020.06.02

(51) Int. Cl. *C12Q 1/04* (2006.01)
G01N 23/00 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(54) СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ ИЗ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ГЕМОКУЛЬТУР МЕТОДОМ МАТРИЧНОЙ ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИОННОЙ ИОНИЗАЦИОННОЙ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ (MALDI-TOF MS) У БОЛЬНЫХ С ИНФЕКЦИЕЙ КРОВОТОКА

(96) 2020000046 (RU) 2020.06.02
(71) Заявитель:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ГЕМАТОЛОГИИ" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБУ "НМИЦ ГЕМАТОЛОГИИ"
МИНЗДРАВА РОССИИ) (RU)**

(72) Изобретатель:
**Клясова Галина Александровна,
Мальчикова Анна Олеговна,
Джулакян Унан Левонович (RU)**

(57) Изобретение относится к области медицины, в частности к микробиологии с возможностью применения у больных в гематологии, и может быть использовано для идентификации бактерий из положительной гемокультуры методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) у больных с инфекцией кровотока. Подготовку положительных гемокультур для идентификации микроорганизмов методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии у больных с инфекцией кровотока проводят путем пробоподготовки положительной гемокультуры к анализу методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии. При этом пробоподготовку положительной гемокультуры осуществляют путем ее переноса из флакона, предназначенного для культивирования микроорганизмов, в пробирку с разделительным гелем и центрифугируют при 3000 оборотах в течение 10 мин. Полученную надосадочную жидкость перемешивают, переносят в микроцентрифужную пробирку и центрифугируют при 3000 оборотах в течение 2 мин. После чего надосадочную жидкость переносят во вторую микроцентрифужную пробирку и центрифугируют при 13000 оборотах в течение 2 мин. Удаляют надосадочную жидкость, в осадок добавляют деионизированную воду и перемешивают на вортексе, а далее добавляют 96% этиловый спирт и еще раз перемешивают на вортексе, после чего центрифугируют при 13000 оборотах в течение 2 мин. Затем удаляют спирт и центрифугируют при 13000 оборотах в течение 2 мин, а остатки спирта удаляют, оставляя микроцентрифужную пробирку с открытой крышкой до полного испарения спирта. Далее проводят экстракцию белкового экстракта муравьиной кислотой и ацетонитрилом перемешивая смесь на вортексе и центрифугируя при 13000 оборотах в течение 2 мин. Полученную надосадочную жидкость наносят на мишень масс-спектрометра, после высыхания покрывают матрицей и проводят идентификацию микроорганизмов методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии у больных с инфекцией кровотока. Технический результат заключается в снижении трудоемкости за счет внесения меньшего количества реагентов и сокращении времени подготовки положительных гемокультур, обеспечивающей высокую точность идентификации микроорганизмов из кровотока, содержащего бактерии.

A1

202000149

202000149

A1

Способ идентификации бактерий из положительных гемокультур методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) у больных с инфекцией кровотока.

Изобретение относится к области медицины, в частности к микробиологии, с возможностью применения у больных в гематологии, и может быть использовано для идентификации бактерий из положительной гемокультуры методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) у больных с инфекцией кровотока.

Инфекции кровотока являются одной из самых распространенных форм внутрибольничной инфекции в различных странах мира. Основная доля инфекций кровотока возникает у пациентов, находящихся в специализированных отделениях, таких как отделения реанимации и интенсивной терапии, гематологии, кардиохирургии, трансплантологии, ожоговые отделения и т.п. Современная высокотехнологичная медицина позволяет достичь высоких результатов лечения данных больных, но наряду с успехами в лечении больных увеличивается риск возникновения тяжелых инфекционных осложнений. Инфекции кровотока являются одним из частых и тяжелых осложнений у иммунокомпрометированных больных.

Развитие инфекций кровотока у иммунокомпрометированных больных происходит как при эндогенном, так и при экзогенном варианте инфицирования микроорганизмами. Эндогенная транслокация бактерий в кровоток происходит, как правило, через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, повреждаемую цитостатическими препаратами или опухолью. Экзогенный вариант развития инфекции включает проникновение микроорганизмов из окружающей среды, их передачу от одного больного другому или через руки медперсонала. Место установки центрального венозного катетера может быть «входными воротами» для микроорганизмов, колонизирующих кожные покровы больного. Возбудители могут мигрировать с кожи больного или с рук медицинского персонала на поверхность катетера по его наружной или внутренней стенке.

Одна из ведущих причин высокой летальности при инфекциях кровотока – это несвоевременная или неадекватная терапия противомикробными препаратами. В этой связи крайне важным является предоставление результатов идентификации микроорганизмов в клинические отделения в максимально короткий срок.

В литературе представлено несколько методов по прямой идентификации микроорганизмов из гемокультур. Известен способ идентификации микроорганизмов из

тестируемого образца гемокультуры. Способ предусматривает получение тестируемого образца, селективный лизис и растворение клеток, не являющихся микроорганизмами тестируемого образца, наслаивание полученного лизата на плотностной буфер в герметичном контейнере и дальнейшее центрифугирование. Плотностной буфер имеет однородную плотность приблизительно от 1,025 г/мл до 1,120 г/мл. При этом микроорганизмы, проходя через указанный буфер, формируют осадок на дне контейнера. Осадок исследуют с использованием рамановской спектроскопии, что позволяет идентифицировать микроорганизм на уровне рода или вида. Изобретение позволяет идентифицировать микроорганизмы из клинических образцов за 120 мин и менее (RU 2541775, 20.02.2015).

Известен способ подготовки первичных монокомпонентных положительных гемокультур для прямой идентификации микроорганизмов методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии, при этом для подготовки к анализу образца из флаконов, содержащих в качестве сорбента полимерные гранулы, к 1 мл его содержимого, помещенного в микропробирку, добавляли 200 мкл 5% водного раствора сапонины для лизиса эритроцитов. Смесь инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, лизат центрифугировали (12 000 об/мин, 1 мин), после чего удаляли супернатант. Далее осадок промывали 1 мл фосфатно-солевого буфера, затем повторно центрифугировали (12 000 об/мин, 1 мин) и удаляли супернатант. К осадку добавляли сначала 300 мкл бидистиллированной воды, перемешивали, затем 900 мкл этанола, далее центрифугировали (12 000 об/мин, 2 мин), удаляли супернатант, осадок подсушивали при комнатной температуре в течение нескольких минут, после чего к нему последовательно добавляли сначала 20 мкл муравьиной кислоты, затем равное количество ацетонитрила. Полученную суспензию перемешивали, после чего вновь центрифугировали (12 000 об/мин, 2 мин), 1 мкл белкового экстракта наносили на мишень масс-спектрометра в двух повторностях, подсушивали, после чего добавляли раствор матрикса (α -циано-4- гидроксикоричная кислота) в соотношении 1:1 и оставляли до полного высыхания. Пробоподготовка образца из флаконов, содержащих в качестве сорбента активный уголь, включала предварительный этап его осаждения путем центрифугирования (400 об/мин, 0,5 мин), не приводящего к седиментации микроорганизмов. Масс-спектры регистрировали в автоматическом режиме в диапазоне 2–20 кД. Исследуемые образцы помещали в вакуумную камеру прибора, где они под воздействием лазерного излучения подвергались мягкой ионизации. Образующиеся при этом заряженные частицы двигались в электрическом поле к аноду-детектору со скоростью, пропорциональной их массе, формируя соответствующий масс-спектр. При сканировании каждого образца снимали по

100 спектров. Идентификацию микроорганизмов осуществляли путем автоматического сравнения полученных масс-спектров с референсной базой данных, содержащей информацию более чем о 950 клинически значимых видах микроорганизмов (Попов Д.А., Овсеенко С.Г. и др. и др. Экспресс-идентификация положительных гемокультур с помощью метода прямой MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Анестезиология и реаниматология, 2015, №5, с. 71-75).

Однако данные способы трудоемки, так как требуют внесения большого количества реагентов. Необходимы простые и надежные способы выделения микроорганизмов из клинических образцов (например, гемокультуры), которые свободны от материалов, способных изменить результат идентификации, и совместимы с технологиями быстрой идентификации.

Технический результат заключается в снижении трудоемкости за счет внесения меньшего количества реагентов и сокращения времени подготовки положительных гемокультур, обеспечивающих высокую точность идентификации микроорганизмов из кровотока, содержащего бактерии.

Технический результат достигается тем, что подготовку положительных гемокультур для идентификации микроорганизмов методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии у больных с инфекцией кровотока проводят путем ее переноса из флакона с жидкой питательной средой и сорбентом для антибиотиков, предназначенного для культивирования микроорганизмов, в пробирку с разделительным гелем и центрифугируют при 3000 оборотах в течение 10 минут, полученную надосадочную жидкость перемешивают, переносят в микроцентрифужную пробирку и центрифугируют при 3000 оборотах в течение 2 минут, после чего надосадочную жидкость переносят во вторую микроцентрифужную пробирку и центрифугируют при 13000 оборотах в течение 2 минут, удаляют надосадочную жидкость, в осадок добавляют деионизированную воду и перемешивают на вортексе, далее добавляют 96% этиловый спирт и еще раз перемешивают на вортексе, после чего центрифугируют при 13000 оборотах в течение 2 минут, затем удаляют спирт и центрифугируют при 13000 оборотах в течение 2 минут, а остатки спирта удаляют, оставляя микроцентрифужную пробирку с открытой крышкой до полного испарения спирта, далее проводят экстракцию белкового экстракта муравьиной кислотой и ацетонитрилом перемешивая смесь на вортексе и центрифугируя при 13000 оборотах в течение 2 минут, полученную надосадочную жидкость наносят на мишень масс-спектрометра, после высыхания покрывают матрицей и проводят идентификацию

микроорганизмов методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии у больных с инфекцией кровотока.

Способ осуществляют следующим образом.

Кровь для микробиологического исследования берут у больных с инфекцией кровотока при температуре от 38° и более из периферической вены или из центрального венозного катетера. Вносят образцы крови в коммерческие флаконы с жидкой питательной средой, предназначенные для аэробного или анаэробного культивирования микроорганизмов (BACTEC Plus Aerobic/F, BACTEC Plus Anaerobic/F, Becton Dickinson). Флаконы с кровью инкубируют в автоматическом анализаторе для гемокультур (BD BACTEC FX, Becton Dickinson). После сигнала прибора о наличии «положительной» гемокультуры (то есть, получен рост микроорганизма во флаконе с питательной средой) проводят пробоподготовку для идентификации микроорганизмов методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии. Для этого из флакона с «положительной» гемокультурой отбирают 5-6 мл крови в пробирку с разделительным гелем. Присутствие клеток крови и белков плазмы искажает интерпретацию белкового спектра бактерий при идентификации методом MALDI-TOF MS непосредственно из положительных флаконов с гемокультурой. Использование пробирок с гелем (например, пробирка Моноветта 7,5 мл сыворотка-гель, Sarstedt AG&Co., Германия), предназначенных для отделения клеточных элементов и белков от сыворотки, способствует увеличению числа удачных идентификаций. Пробирку с разделительным гелем и образцом положительной гемокультуры центрифугируют при 3000 оборотах в течение 10 минут. После центрифугирования бактерии находятся на поверхности геля. Затем аккуратно перемешивают полученную надосадочную жидкость в пробирке стерильной одноразовой пипеткой (примерно 15 сек). Далее 1 мл полученной надосадочной жидкости помещают в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 3000 оборотах в течение 2 минут. После центрифугирования белки и форменные элементы оседают на дно пробирки. Затем 1 мл надосадочной жидкости переносят во вторую микроцентрифужную пробирку и центрифугируют при 13000 оборотах в течение 2 минут. После центрифугирования бактерии оседают на дно второй микроцентрифужной пробирки. Надосадочную жидкость удаляют и далее работают с осадком, в котором находятся бактерии. В полученный осадок добавляют 300 мкл деионизированной воды и перемешивают на вортексе в течение 30 сек. Затем добавляют 900 мкл 96% этилового спирта и еще раз перемешивают на вортексе в течение 30 сек после чего центрифугируют при 13000 оборотах в течение 2 минут. Из пробирки удаляют большую часть спирта и еще раз центрифугируют при 13000 оборотах в течение 2 минут.

Остатки спирта (примерно 100-200 мкл) удаляют, затем оставляют микроцентрифужную пробирку с открытой крышкой для полного испарения спирта на 5-7 мин. Далее осуществляют экстракцию белков, добавляя муравьиную кислоту пропорционально количеству осадка (10-30 мкл), перемешивают на вортексе, затем добавляют столько же ацетонитрила (10-30 мкл) и вновь перемешивают на вортексе, далее центрифугируют при 13000 оборотах в течение 2 минут. Полученную надосадочную жидкость наносят на мишень (слайд) масс-спектрометра и после полного высыхания (примерно в течение 5 мин) покрывают «матрицей», содержащей α -циано-4-гидроксикоричную кислоту и раствор 50% ацетонитрила в сочетании с 2,5% трифторуксусной кислоты. Образец полностью высушивают при комнатной температуре примерно в течение 5 мин. Затем мишень устанавливают в анализатор Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия) и проводят идентификацию микроорганизмов методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии.

В период с апреля 2018 года по март 2019 была исследована 131 положительная гемокультура от больных с инфекцией кровотока. Кровь для микробиологического исследования брали от больных с инфекцией кровотока при температуре от 38⁰ и более из периферической вены или из центрального венозного катетера. Вносили образцы крови в коммерческие флаконы с жидкой питательной средой, предназначенные для аэробного или анаэробного культивирования микроорганизмов (BACTEC Plus Aerobic/F, BACTEC Plus Anaerobic/F, Becton Dickinson) и культивировали в автоматическом анализаторе гемокультур (BD BACTEC FX, Becton Dickinson). После получения сигнала анализатора о наличии роста микроорганизмов во флаконе с гемокультурой проводили ускоренную идентификацию микроорганизмов с использованием предложенной методики (описано выше). Параллельно проводили исследование классическим методом: содержимое флакона переносили на плотные питательные среды, инкубировали чашки Петри в термостате и после получения культуры идентифицировали полученные микроорганизмы методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии.

Из всех флаконов для культивирования микроорганизмов с положительной гемокультурой был выделен 131 микроорганизм в монокультуре, из них 53 – грамотрицательных бактерий и 78 грамположительных бактерий. Спектр микроорганизмов, полученных из положительных гемокультур, представлен в таблице 1.

Таблица 1. Спектр микроорганизмов, выделенных из положительных гемокультур.

Микроорганизмы	Абсолютное число	%
Грамположительные бактерии	78	59,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16	12,2
<i>Enterococcus faecium</i>	14	10,7
<i>Streptococcus</i> группы <i>viridans</i>	11	8,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	5,3
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	7	5,3
<i>Staphylococcus hominis</i>	7	5,3
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	3,8
<i>Abiotrophia defectiva</i>	2	1,5
<i>Brevibacterium casei</i>	2	1,5
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	2	1,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	0,8
<i>Micrococcus luteus</i>	1	0,8
<i>Rothia mucilaginosa</i>	1	0,8
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	0,8
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0,8
Грамотрицательные бактерии	53	40,5
<i>Escherichia coli</i>	19	14,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	8,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	7,6
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	5	3,8
<i>Serratia liquefaciens</i>	2	1,5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0,8
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1	0,8
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1	0,8
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0,8
<i>Neisseria elongata</i>	1	0,8
<i>Pseudomonas monteilii</i>	1	0,8
Всего	131	

При использовании предложенной ускоренной методики успешная идентификация микроорганизмов до рода была получена в 79,4% (в 104 из 131) случаев, до вида – в 74% (97 из 131). Идентификация до рода грамотрицательных бактерий была в 96,2% (в 51 из 53) случаев, грамположительных бактерий – в 67,9% (в 53 из 78) (таблица 2). Результаты идентификации до рода микроорганизмов, полученные предложенным методом, полностью (100%) совпадали с результатами идентификации после культивирования микроорганизмов классическим методом. Расхождения в идентификации до вида были только в 4,1% (в 4 из 97) случаях, но эти бактерии были правильно определены до рода (*Streptococcus oralis* вместо *Streptococcus mitis*, *Enterobacter kobei* вместо *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae* вместо *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter cloacae* вместо

Enterobacter asburiae). Следует отметить, что *S. oralis* и *S. mitis* относятся к одной группе *Streptococcus* группы *viridans*, а *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. kobei* относятся к *Enterobacter cloacae* complex, и для этих групп бактерий существуют одни и те же антибиотики для лечения. В таблице 2 используются следующие сокращения: 1 – грам+ – грамположительные микроорганизмы; 2 – грам- – грамотрицательные микроорганизмы; м/о – микроорганизм. Если при идентификации предложенным методом не было результатов, то в столбце «Идентификация рода и вида м/о» проставлено значение «Нет идентификации», а в столбцах «Коэффициент идентификации в усл.ед. (Score)», «Разница во времени идентификации м/о между двумя методами, часы», «1 – совпадение, 0 – несовпадение» нет значений.

Таблица 2. Результаты идентификации бактерий предложенным и классическим методом

№ п/п	Номер образца	Время инкубации в анализаторе до положительного сигнала, часы	Результаты микроскопии (1-грам+, 2-грам-)	Предложенный метод идентификации м/о				Классический метод идентификации м/о			Разница во времени идентификации м/о между двумя методами, часы	1 - совпадение, 0 - несовпадение
				Период от начала инкубации до идентификации, часы	Время, затраченное на пробоподготовку и идентификацию, часы	Идентификация рода и вида м/о	Коэффициент идентификации в усл.ед. (Score)	Период от начала инкубации до идентификации, часы	Идентификация рода и вида м/о	Коэффициент идентификации в усл.ед. (Score)		
1	884	15:44	1	16:36	0:52	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,8	41:00	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,0	24:24	1
2	883	15:54	1	16:42	0:48	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,8	41:00	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,0	24:18	1
3	896	11:02	1	12:02	1:00	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,0	34:20	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,0	22:18	1
4	897	10:52	1	11:42	0:50	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,0	34:20	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,0	22:38	1
5	915	11:06	2	12:01	0:55	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,0	20:00	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,0	7:59	1
6	964	20:08	2	20:56	0:48	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,0	46:05	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,0	25:09	1
7	966	11:20	2	12:02	0:42	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2,0	37:25	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2,0	25:23	1
8	988	21:00	1		1:00	Нет идентификации		42:00	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,0		
9	996	3:50	2	4:44	0:54	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,1	20:20	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,1	15:36	1
10	1000	13:00	1	13:47	0:47	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,8	41:30	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,0	27:43	1
11	999	21:21	1		1:00	Нет идентификации		41:30	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,0		
12	1093	10:02	2	10:55	0:53	<i>Escherichia coli</i>	2,0	34:00	<i>Escherichia coli</i>	2,1	23:05	1

Продолжение таблицы 2.

№ п/п	Номер образца	Время инкубации в анализаторе до положительного сигнала, часы	Результаты микроскопии (1-грам+, 2-грам-)	Предложенный метод идентификации м/о				Классический метод идентификации м/о			Разница во времени идентификации м/о между двумя методами, часы	1 - совпадение, 0 - несовпадение
				Период от начала инкубации до идентификации, часы	Время, затраченное на пробоподготовку и идентификацию, часы	Идентификация рода и вида м/о	Коэффициент идентификации в усл.ед. (Score)	Период от начала инкубации до идентификации, часы	Идентификация рода и вида м/о	Коэффициент идентификации в усл.ед. (Score)		
13	1103	17:10	2	17:59	0:49	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,1	43:00	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,2	25:01	1
14	1214	42:05	1	42:56	0:51	<i>Enterococcus faecium</i>	2,1	68:10	<i>Enterococcus faecium</i>	2,0	25:14	1
15	1243	11:45	2	12:37	0:52	<i>Escherichia coli</i>	2,2	37:00	<i>Escherichia coli</i>	2,0	24:23	1
16	1245	15:18	1	16:12	0:54	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,0	42:30	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,0	26:18	1
17	1360	22:55	2	23:55	1:00	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,0	45:30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,1	21:35	1
18	1368	9:35	1	10:29	0:54	<i>Streptococcus mitis</i>	2,0	36:20	<i>Streptococcus mitis</i>	2,0	25:51	1
19	1374	20:00	2	20:50	0:50	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,1	44:50	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,1	24:00	1
20	1407	14:43	2	15:43	1:00	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,1	83:00	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,0	67:17	1
21	1460	10:20	2	11:08	0:48	<i>Escherichia coli</i>	2,2	84:30	<i>Escherichia coli</i>	2,2	73:22	1
22	1567	11:03	2	11:53	0:50	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,0	17:40	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,0	5:47	1
23	1615	20:05	1	20:57	0:52	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,8	40:50	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,0	19:53	1
24	1636	12:58	1	13:58	1:00	<i>Streptococcus salivarius</i>	1,8	18:10	<i>Streptococcus salivarius</i>	2,0	4:12	1
25	1645	19:15	2	20:10	0:55	<i>Escherichia coli</i>	1,9	24:50	<i>Escherichia coli</i>	2,0	4:40	1
26	1647	11:00	1	11:48	0:48	<i>Streptococcus spp.</i>	1,7	24:10	<i>Streptococcus oralis</i>	2,2	12:22	1
27	1648	14:00	1	14:49	0:49	<i>Streptococcus spp.</i>	1,7	114:10	<i>Streptococcus oralis</i>	2,3	74:21	1
28	1678	61:29	1		0:55	Нем идентификации		135:35	<i>Enterococcus faecium</i>	2,2		
29	1741	17:44	1	18:36	0:52	<i>Enterococcus faecium</i>	2,0	47:16	<i>Enterococcus faecium</i>	2,2	28:40	1
30	1742	29:51	1	30:42	0:51	<i>Enterococcus faecium</i>	2,0	47:16	<i>Enterococcus faecium</i>	2,2	16:34	1
31	1749	15:05	1	15:57	0:52	<i>Enterococcus faecium</i>	2,0	33:10	<i>Enterococcus faecium</i>	2,2	17:13	1
32	1754	11:41	2	12:41	1:00	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,3	37:30	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,3	24:49	1

Продолжение таблицы 2.

№ п/п	Номер образца	Время инкубации в анализаторе до положительного сигнала, часы	Результаты микроскопии (1-грам+, 2-грам-)	Предложенный метод идентификации м/о				Классический метод идентификации м/о			Разница во времени идентификации м/о между двумя методами, часы	1 - совпадение, 0 - несовпадение
				Период от начала инкубации до идентификации, часы	Время, затраченное на пробоподготовку и идентификацию, часы	Идентификация рода и вида м/о	Коэффициент идентификации в усл.ед. (Score)	Период от начала инкубации до идентификации, часы	Идентификация рода и вида м/о	Коэффициент идентификации в усл.ед. (Score)		
33	1784	15:29	1	16:21	0:52	<i>Enterococcus faecium</i>	2,0	42:50	<i>Enterococcus faecium</i>	2,2	26:29	1
34	1791	12:32	2	13:26	0:54	<i>Escherichia coli</i>	2,0	17:25	<i>Escherichia coli</i>	2,2	3:59	1
35	1792	12:44	2	13:32	0:48	<i>Escherichia coli</i>	2,0	17:25	<i>Escherichia coli</i>	2,2	3:53	1
36	1808	19:45	1	20:39	0:54	<i>Enterococcus faecium</i>	2,0	43:30	<i>Enterococcus faecium</i>	2,2	22:51	1
37	1812	9:05	1	9:59	0:54	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,8	33:30	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,9	23:31	1
38	1865	13:55	1		0:50	Нет идентификации		33:45	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,2		
39	1871	16:18	1	17:10	0:52	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,8	34:10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,9	17:00	1
40	1914	22:43	1	23:38	0:55	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,8	42:20	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,0	18:42	1
41	1992	9:43	2	10:43	1:00	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,9	34:00	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,1	23:17	1
42	1993	9:53	2	10:53	1:00	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,9	34:00	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,2	23:07	1
43	1995	19:30	1		0:48	Нет идентификации		25:05	<i>Staphylococcus hominis</i>	1,8		
44	2002	13:43	1		1:00	Нет идентификации		28:20	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,0		
45	2081	12:05	2	13:00	0:55	<i>Escherichia coli</i>	2,4	19:05	<i>Escherichia coli</i>	2,3	6:05	1
46	2135	16:49	2	17:41	0:52	<i>Serratia liquefaciens</i>	1,7	23:55	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,1	6:14	1
47	2136	17:37	2		0:48	Нет идентификации		23:55	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,2		
48	2241	18:19	1		0:52	Нет идентификации		35:20	<i>Streptococcus mitis</i>	2,1		
49	2242	15:29	2	16:19	0:50	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,3	34:45	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,3	18:26	1
50	2243	11:28	2	12:18	0:50	<i>Escherichia coli</i>	2,3	34:45	<i>Escherichia coli</i>	2,3	22:27	1
51	2250	16:44	1	17:37	0:53	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,2	38:20	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,1	20:43	1
52	2260	22:45	2	23:33	0:48	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,3	46:00	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,3	22:27	1

Продолжение таблицы 2.

№ п/п	Номер образца	Время инкубации в анализаторе до положительного сигнала, часы	Результаты микроскопии (1-грам+, 2-грам-)	Предложенный метод идентификации м/о				Классический метод идентификации м/о			Разница во времени идентификации м/о между двумя методами, часы	1 - совпадение, 0 - несовпадение
				Период от начала инкубации до идентификации, часы	Время, затраченное на пробоподготовку и идентификацию, часы	Идентификация рода и вида м/о	Коэффициент идентификации в усл.ед. (Score)	Период от начала инкубации до идентификации, часы	Идентификация рода и вида м/о	Коэффициент идентификации в усл.ед. (Score)		
53	2266	12:20	2	13:00	0:40	<i>Escherichia coli</i>	2,2	39:00	<i>Escherichia coli</i>	2,3	26:00	1
54	2269	12:45	1	13:33	0:48	<i>Streptococcus oralis</i>	2,4	34:30	<i>Streptococcus oralis</i>	2,2	20:57	0
55	2309	68:00	1	68:54	0:54	<i>Enterococcus faecium</i>	1,9	93:55	<i>Enterococcus faecium</i>	2,1	25:01	1
56	2372	17:30	1		1:00	Нет идентификации		34:55	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,2		
57	2380	9:20	1	10:14	0:54	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,7	82:45	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,4	72:31	1
58	2408	21:15	2	22:04	0:49	<i>Pseudomonas mantelii</i>	1,7	40:55	<i>Pseudomonas monteilii</i>	2,2	18:51	1
59	2414	14:06	1	14:46	0:40	<i>Enterococcus faecium</i>	2,2	45:20	<i>Enterococcus faecium</i>	2,4	30:34	1
60	1782	62:50	1		0:49	Нет идентификации		90:30	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1,7		
61	2465	15:33	1	16:21	0:48	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,2	36:33	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,3	20:12	1
62	2466	12:03	1	12:51	0:48	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,1	36:33	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,2	23:42	1
63	2467	11:30	2	12:30	1:00	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,3	36:10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,3	23:40	1
64	2497	22:10	1		0:54	Нет идентификации		44:30	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,4		
65	2501	26:02	1	26:50	0:48	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,1	93:50	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,3	67:00	1
66	2557	56:35	1		0:49	Нет идентификации		132:50	<i>Brevibacterium casei</i>	1,9		
67	2572	11:35	2	12:24	0:49	<i>Escherichia coli</i>	2,3	35:00	<i>Escherichia coli</i>	2,3	22:36	1
68	2573	18:02	2	18:50	0:48	<i>Escherichia coli</i>	2,3	35:00	<i>Escherichia coli</i>	2,3	16:10	1
69	2597	37:10	1		1:00	Нет идентификации		61:10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,1		
70	2613	18:05	2	18:59	0:54	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,3	36:00	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,3	17:01	1
71	2604	58:10	1		0:50	Нет идентификации		88:20	<i>Brevibacterium casei</i>	1,8		
72	2621	23:20	1		1:00	Нет идентификации		41:05	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	2,0		

Продолжение таблицы 2.

№ п/п	Номер образца	Время инкубации в анализаторе до положительного сигнала, часы	Результаты микроскопии (1-грам+, 2-грам-)	Предложенный метод идентификации м/о				Классический метод идентификации м/о			Разница во времени идентификации м/о между двумя методами, часы	1 - совпадение, 0 - несовпадение
				Период от начала инкубации до идентификации, часы	Время, затраченное на пробоподготовку и идентификацию, часы	Идентификация рода и вида м/о	Коэффициент идентификации в усл.ед. (Score)	Период от начала инкубации до идентификации, часы	Идентификация рода и вида м/о	Коэффициент идентификации в усл.ед. (Score)		
73	2622	22:00	1		0:52	<i>Hem</i> <i>идентификации</i>		41:05	<i>Corynebacteriu</i> <i>m amycolatum</i>	2,0		
74	2669	13:55	2	14:43	0:48	<i>Escherichia coli</i>	2,3	37:45	<i>Escherichia coli</i>	2,4	23:02	1
75	2673	15:54	2	16:42	0:48	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,1	41:54	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,3	25:12	1
76	2675	11:35	2	12:25	0:50	<i>Escherichia coli</i>	2,4	40:55	<i>Escherichia coli</i>	2,4	28:30	1
77	2682	22:50	2	23:38	0:48	<i>Escherichia coli</i>	2,3	44:50	<i>Escherichia coli</i>	2,2	21:12	1
78	2708	20:48	1	21:40	0:52	<i>Staphylococcus spp.</i>	1,6	45:20	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,1	23:40	1
79	2710	13:30	2	14:19	0:49	<i>Enterobacter kobei</i>	2,2	40:50	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,1	26:31	0
80	2711	12:30	2	13:19	0:49	<i>Enterobacter asburiae</i>	2,1	40:50	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,1	27:31	0
81	2742	10:04	1	10:57	0:53	<i>Streptococcus spp.</i>	1,5	39:00	<i>Streptococcus mitis</i>	2,0	28:03	1
82	2743	9:47	1		0:52	<i>Hem</i> <i>идентификации</i>		63:00	<i>Streptococcus oralis</i>	2,1		
83	2917	42:46	1		0:40	<i>Hem</i> <i>идентификации</i>		129:30	<i>Streptococcus salivarius</i>	2,0		
84	2957	11:07	1	12:07	1:00	<i>Streptococcus mitis</i>	1,8	35:45	<i>Streptococcus mitis</i>	2,3	23:38	1
85	3030	14:30	2	15:18	0:48	<i>Escherichia coli</i>	2,2	35:30	<i>Escherichia coli</i>	2,1	20:12	1
86	3081	14:35	2	15:23	0:48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,0	46:15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,1	30:52	1
87	3186	15:38	1	16:26	0:48	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,8	44:28	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2,1	28:02	1
88	3194	17:10	1	17:58	0:48	<i>Staphylococcus spp.</i>	1,4	44:00	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,9	26:02	1
89	3257	16:55	2	17:49	0:54	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,7	35:40	<i>Enterobacter asburiae</i>	2,2	17:51	0
90	3259	13:41	1	14:32	0:51	<i>Enterococcus faecium</i>	2,1	41:40	<i>Enterococcus faecium</i>	2,1	27:08	1
91	3260	13:41	1	14:41	1:00	<i>Enterococcus faecium</i>	2,2	41:40	<i>Enterococcus faecium</i>	2,2	26:59	1
92	3261	29:30	1		0:48	<i>Hem</i> <i>идентификации</i>		154:10	<i>Abiotrophia defectiva</i>	2,0		

Продолжение таблицы 2.

№ п/п	Номер образца	Время инкубации в анализаторе до положительного сигнала, часы	Результаты микроскопии (1-грам+, 2-грам-)	Предложенный метод идентификации м/о				Классический метод идентификации м/о			Разница во времени идентификации м/о между двумя методами, часы	1 - совпадение, 0 - несовпадение
				Период от начала инкубации до идентификации, часы	Время, затраченное на пробоподготовку и идентификацию, часы	Идентификация рода и вида м/о	Коэффициент идентификации в усл.ед. (Score)	Период от начала инкубации до идентификации, часы	Идентификация рода и вида м/о	Коэффициент идентификации в усл.ед. (Score)		
93	3262	63:17	1		1:00	Нет идентификации		154:10	<i>Abiotrophia defectiva</i>	2,1		
94	3263	73:17	1		0:52	Нет идентификации		141:30	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2,0		
95	3264	20:00	1		0:48	Нет идентификации		45:30	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2,0		
96	3278	20:12	1		0:49	Нет идентификации		88:20	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2,3		
97	3315	11:15	1	12:07	0:52	<i>Sterptococcus agalactiae</i>	2,1	38:00	<i>Sterptococcus agalactiae</i>	2,2	25:53	1
98	3335	16:53	2	17:41	0:48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,3	35:20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,3	17:39	1
99	3336	13:33	2	14:24	0:51	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,2	35:20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,2	20:56	1
100	3412	29:59	2		1:00	Нет идентификации		58:08	<i>Neisseria elongata</i>	1,9		
101	3423	16:00	1	16:48	0:48	<i>Enterococcus faecium</i>	1,9	95:00	<i>Enterococcus faecium</i>	1,9	72:12	1
102	3431	18:12	1	19:01	0:49	<i>Staphylococcus hominis</i>	1,9	91:00	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,2	71:59	1
103	3465	20:21	1	21:11	0:50	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,2	43:30	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,1	22:19	1
104	3506	16:13	2	17:08	0:55	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,1	83:00	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,3	65:52	1
105	3530	21:59	1		0:54	Нет идентификации		42:00	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,3		
106	3531	17:07	1	17:59	0:52	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,1	42:00	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,1	24:01	1
107	3561	14:03	1	14:53	0:50	<i>Enterococcus faecium</i>	2,2	38:50	<i>Enterococcus faecium</i>	2,2	23:57	1
108	79	22:45	1	23:33	0:48	<i>Staphylococcus spp.</i>	1,5	96:20	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,2	72:47	1
109	103	11:26	1	12:14	0:48	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	2,2	43:15	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	1,8	31:01	1
110	119	13:36	2	14:28	0:52	<i>Escherichia coli</i>	2,2	39:30	<i>Escherichia coli</i>	2,2	25:02	1
111	120	11:48	2	12:42	0:54	<i>Escherichia coli</i>	2,3	39:30	<i>Escherichia coli</i>	2,2	26:48	1
112	197	11:32	2	12:32	1:00	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	2,1	35:30	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	2,1	22:58	1

Продолжение таблицы 2.

№ п/п	Номер образца	Время инкубации в анализаторе до положительного сигнала, часы	Результаты микроскопии (1-грам+, 2-грам-)	Предложенный метод идентификации м/о				Классический метод идентификации м/о			Разница во времени идентификации м/о между двумя методами, часы	1 - совпадение, 0 - несовпадение
				Период от начала инкубации до идентификации, часы	Время, затраченное на пробоподготовку и идентификацию, часы	Идентификация рода и вида м/о	Коэффициент идентификации в усл.ед. (Score)	Период от начала инкубации до идентификации, часы	Идентификация рода и вида м/о	Коэффициент идентификации в усл.ед. (Score)		
113	231	19:39	1	20:27	0:48	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,2	44:25	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,2	23:58	1
114	233	17:36	2	18:30	0:54	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,1	45:50	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,3	27:20	1
115	234	36:13	2	37:01	0:48	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,9	46:20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,3	9:19	1
116	277	63:20	1		1:00	Нем идентификации		90:00	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,0		
117	298	16:04	2	16:44	0:40	<i>Escherichia coli</i>	2,4	36:03	<i>Escherichia coli</i>	2,2	19:19	1
118	312	28:10	1	29:00	0:50	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,8	58:20	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,1	29:20	1
119	336	18:00	1	18:55	0:55	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,7	37:00	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2,1	18:05	1
120	341	20:36	1	21:28	0:52	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,4	91:00	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,1	69:32	1
121	359	20:49	1	21:40	0:51	<i>Rothia mucilaginosa</i>	2,1	84:25	<i>Rothia mucilaginosa</i>	2,1	62:45	1
122	377	43:47	1		0:54	Нем идентификации		70:20	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2,0		
123	452	17:40	1	18:30	0:50	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,9	39:00	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,1	20:30	1
124	495	15:46	1	16:38	0:52	<i>Enterococcus faecium</i>	2,2	45:40	<i>Enterococcus faecium</i>	2,5	29:02	1
125	502	17:53	1	18:53	1:00	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,0	42:00	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,1	23:07	1
126	538	45:25	2	46:12	0:47	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1,5	93:15	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1,8	47:03	1
127	608	10:13	2	11:01	0:48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,3	34:10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,3	23:09	1
128	650	20:07	1	21:01	0:54	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,1	42:30	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,2	21:29	1
129	677	29:10	1	29:58	0:48	<i>Micrococcus spp.</i>	1,6	55:50	<i>Micrococcus luteus</i>	2,1	25:52	1
130	683	13:00	2	14:00	1:00	<i>Escherichia coli</i>	2,3	39:00	<i>Escherichia coli</i>	2,3	25:00	1
131	747	12:37	2	13:31	0:54	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,3	35:05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,3	21:34	1

Медиана длительности инкубации флаконов с гемокультурой до получения положительного сигнала составила 16 ч 13 мин (разброс от 3 ч 50 мин до 73 ч 17 мин), причем, медиана инкубации грамотрицательных бактерий была меньше, чем грамположительных бактерий и составила 13 ч 36 мин (разброс от 3 ч 50 мин до 45 ч 25 мин) против 18 ч 56 мин (разброс от 9 ч 5 мин до 73 ч 17 мин), $p = 0,0002$. Медиана времени, затраченного на пробоподготовку и идентификацию микроорганизмов предложенным методом, составила 52 мин (разброс от 40 мин до 60 мин). Предложенным методом суммарное время от начала инкубации гемокультур в анализаторе до идентификации микроорганизмов и передачи результатов исследования в клинические отделения составило 17 ч 8 мин, для грамотрицательных бактерий – 14 ч 28 мин, для грамположительных бактерий – 18 ч 54 мин, таблица 3. Классическим методом (получение роста бактерий на плотных питательных средах и проведение их идентификации) период от начала инкубации флаконов в автоматическом анализаторе до идентификации микроорганизмов составил 41 ч 5 мин. Таким образом, предложенный метод позволяет идентифицировать микроорганизмы на 23 ч 41 мин раньше и существенно сократить время представления результатов в клинику, чем при использовании классического метода идентификации, различия во времени статистически значимы ($p < 0,001$). Время от начала инкубации до идентификации микроорганизмов предложенным методом и классическим методом для разных видов бактерий представлено в таблице 3.

Таблица 3. Время от начала инкубации до идентификации микроорганизмов предложенным методом и классическим методом

Микроорганизмы	Идентификация				p
	предложенным методом		классическим методом		
	медиана (часы)	разброс (часы)	медиана (часы)	разброс (часы)	
Грамположительные бактерии, n=80	18:54	9:59 – 74:9	42:40	18:10-154:10	<0,001
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , n=16	19:43	9:59 - 64:20	41:15	28:20-90:00	<0,001
<i>Enterococcus faecium</i> , n=14	16:43	14:32 - 68:54	45:30	33:10-135:35	<0,001
<i>Streptococcus gr. viridans</i> , n=11	12:14	10:29-43:26	36:20	18:10-129:30	<0,001
<i>Staphylococcus aureus</i> , n=7	14:45	10:14-22:53	38:20	33:45-82:45	0,002
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> , n=7	20:48	16:12-74:09	45:30	37:00 - 141:30	0,035
<i>Staphylococcus hominis</i> , n=7	20:18	16:12-23:33	42:30	25:05-96:20	0,002
<i>Enterococcus faecalis</i> , n=5	21:28	12:51-26:50	44:30	36:33-93:50	0,009
<i>Abiotrophia defective</i> , n=2	47:17	30:18-64:17	154:10	н/п	0,1
<i>Brevibacterium casei</i> , n=2	58:12	57:24-59:00	110:35	88:20-132:50	0,12
<i>Corynebacterium amycolatum</i> , n=2	23:36	22:52-24:20	41:05	н/п	0,1
<i>Listeria monocytogenes</i> , n=1	20:27		44:25		н/п
<i>Micrococcus luteus</i> , n=1	30:00		55:50		н/п
<i>Rothia mucilaginosa</i> , n=1	21:40		84:25		н/п
<i>Staphylococcus cohnii</i> , n=1	63:39		90:30		н/п
<i>Streptococcus agalactiae</i> , n=1	12:07		38:00		н/п
Грамотрицательные бактерии, n=53	14:28	4:44 - 46:12	37:00	17:25 - 93:15	<0,001
<i>Escherichia coli</i> , n=19	13:26	10:55 - 23:38	36:03	17:25 - 84:30	<0,001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , n=11	18:59	15:43 - 37:01	45:30	34:45 - 83:00	<0,001
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , n=10	12:35	10:43 - 17:41	35:12	20:00 - 46:15	<0,001
<i>Enterobacter cloacae</i> complex, n=5	13:19	4:44 - 17:49	35:40	17:40 - 40:50	0,016
<i>Serratia liquefaciens</i> , n=2	18:03	17:41 - 18:25	23:55	н/п	0,1
<i>Acinetobacter baumannii</i> , n=1	12:02		37:25		н/п
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i> , n=1	12:32		35:30		н/п
<i>Fusobacterium nucleatum</i> , n=1	46:12		93:15		н/п
<i>Klebsiella oxytoca</i> , n=1	17:08		83:00		н/п
<i>Neisseria elongata</i> , n=1	30:59		58:08		н/п
<i>Pseudomonas monteilii</i> , n=1	22:04		40:55		н/п
Все микроорганизмы	17:02	4:44 – 74:9	41:05	17:25 - 154:10	<0,001

Примечание. н/п – не применимо.

Примеры реализации предлагаемого способа ускоренной идентификации бактерий.

Пример 1.

Больной К., 27 лет, с диагнозом острый миелобластный лейкоз поступил в стационар для проведения трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТКМ) от неродственного HLA-идентичного донора. Больному было проведено предтрансплантационное кондиционирование в миелоаблативном режиме, включавшее бусульфан, циклофосфамид и антитимоцитарный глобулин. Алло-ТКМ была выполнена 05.02.2019. На фоне миелотоксического агранулоцитоза (08.02.2019) у больного появилась диарея, а через несколько дней (12.08.2019) – мукозит. Повышение температуры до 39,2°C было констатировано 13.02.2019. После выполнения микробиологического исследования крови из периферической вены и центрального венозного катетера был назначен цефоперазон/сульбактам. Через 10 часов 30 минут (14.02.2019) после начала инкубации крови во флаконах, предназначенных для культивирования микроорганизмов, был зарегистрирован рост микроорганизмов. Сразу после сигнала автоматического анализатора гемокультур был использован предложенный метод подготовки положительной гемокультуры для идентификации микроорганизмов методом MALDI-TOF MS, и параллельно был проведен посев содержимого флакона с положительной гемокультурой на плотные питательные среды (классический метод). Через 50 минут была получена идентификация микроорганизмов предложенным методом, были идентифицированы два микроорганизма – *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. В этот же день (14.02.2019) у больного было отмечено ухудшение состояния в виде повышения температуры до 39°C с ознобом и повышением содержания лактата в крови до 6,7 ммоль/л (допустимые значения 0,5-1,6 ммоль/л). Таким образом, у больного был диагностирован сепсис, вызванный двумя грамотрицательными микроорганизмами. Сразу после получения результатов идентификации микроорганизмов предложенным методом была проведена эскалация антибактериальной терапии, включавшая отмену цефоперазона/сульбактама и назначение меропенема и колистина. Результат идентификации микроорганизмов классическим методом был получен только на следующий день (15.02.2019) и подтвердил полностью видовую принадлежность микроорганизмов. Время от начала инкубации флакона с гемокультурой до идентификации микроорганизмов предложенным методом составило 11 ч 20 мин, классическим методом – 37 ч 15 мин. На фоне антибактериальной терапии было достигнуто клиническое улучшение в виде снижения температуры с 39,2°C до 37°C, регрессировали симптомы сепсиса. Целевая противомикробная терапия была реализована

через 11 ч 20 мин от момента возникновения температуры. Колистин был отменен через 12 дней, меропенем – через 18 дней. Перевода больного в отделение реанимации не было.

Пример 2.

Больная Н., 64 года, с диагнозом острый миелоидный лейкоз поступила в стационар для проведения четвертого курса химиотерапии по программе децитабин-цитабарин-идарубицин. На фоне миелотоксического агранулоцитоза 04.03.2019 у больной было отмечено повышение температуры до 39,6°C. После выполнения микробиологического исследования крови из периферической вены и центрального венозного катетера был назначен цефоперазон/сульбактам. Через 10 часов 13 минут (05.03.2019) после начала инкубации крови во флаконах, предназначенных для культивирования микроорганизмов, был зарегистрирован рост микроорганизмов. Сразу после сигнала автоматического анализатора гемокультур была проведена идентификация микроорганизмов предложенным методом, и параллельно был проведен посев содержимого флакона с положительной гемокультурой на плотные питательные среды (классический метод). Через 51 минут была получена идентификация микроорганизмов предложенным методом, были идентифицированы *Klebsiella pneumoniae*. Сразу после получения результатов идентификации микроорганизмов предложенным методом была проведена эскалация антибактериальной терапии, включавшая отмену цефоперазона/сульбактама и назначение меропенема и амикацина. Результат идентификации микроорганизмов классическим методом из гемокультуры был получен только на следующий день и подтвердил полностью видовую принадлежность микроорганизмов. Время от начала инкубации флакона с гемокультурой до идентификации микроорганизмов предложенным методом составило 11 ч 4 мин, классическим методом – 34 ч 10 мин. На момент идентификации классическим методом (06.03.2019) на фоне антибактериальной терапии было достигнуто клиническое улучшение в виде снижения температуры с 39,6°C до 37°C. Целевая противомикробная терапия была реализована через 11 ч 4 мин от момента возникновения температуры. В результате лечения было отмечено улучшение состояния больного. Амикацин был отменен через 8 суток, а меропенем – через 10 суток применения.

Таким образом, предложенный способ продемонстрировал высокую точность идентификации микроорганизмов у больных с инфекцией кровотока сравнимую с классическим методом, при статистически значимом временном сокращении исследования (17 ч 2 мин против 41 ч 5 мин, $p < 0,001$). Метод не трудоемкий и требует внесения меньшего количества реагентов, чем в других методиках, так как отделение форменных элементов крови от плазмы и бактерий происходит за счет разделительного

геля, находящегося в пробирке. На основании полученных результатов данный метод подготовки гемокультур для идентификации бактерий может быть рекомендован для использования в рутинной практике лабораторий микробиологии с целью сокращения времени представления результата по идентификации микроорганизмов в клинические отделения у больных с инфекцией кровотока.

Формула изобретения

Способ идентификации бактерий из положительных гемокультур методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии у больных с инфекцией кровотока, включающий пробоподготовку положительной гемокультуры к анализу методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии, отличающийся тем, что пробоподготовку положительной гемокультуры осуществляют путем ее переноса из флакона, предназначенного для культивирования микроорганизмов, в пробирку с разделительным гелем и центрифугируют при 3000 оборотах в течение 10 минут, полученную надосадочную жидкость перемешивают, переносят в микроцентрифужную пробирку и центрифугируют при 3000 оборотах в течение 2 минут, после чего надосадочную жидкость переносят во вторую микроцентрифужную пробирку и центрифугируют при 13000 оборотах в течение 2 минут, удаляют надосадочную жидкость, в осадок добавляют деионизированную воду и перемешивают на вортексе, а далее добавляют 96% этиловый спирт и еще раз перемешивают на вортексе, после чего центрифугируют при 13000 оборотах в течение 2 минут, затем удаляют спирт и центрифугируют при 13000 оборотах в течение 2 минут, а остатки спирта удаляют, оставляя микроцентрифужную пробирку с открытой крышкой до полного испарения спирта, далее проводят экстракцию белкового экстракта муравьиной кислотой и ацетонитрилом перемешивая смесь на вортексе и центрифугируя при 13000 оборотах в течение 2 минут, полученную надосадочную жидкость наносят на мишень масс-спектрометра, после высыхания покрывают матрицей и проводят идентификацию микроорганизмов методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии у больных с инфекцией кровотока.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202000149

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C12Q 1/04 (2006.01)
G01N 23/00 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C12Q 1/04, G01N 23/00, G01N 33/49, C12N 1/20, C12R 1/01

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	ПОПОВ Д.А. и др. Ускоренные методы идентификации положительных гемокультур с применением MALD-TOF масс-спектрометрии. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2016, том 18, № 4, с. 296-307, ISSN: 1684-4386, с. 299, столбец 2, строки 22-28, 38-50	1
Y	ЧЕБОТАРЬ И.В. и др. Использование метода времяпролетной массспектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) для идентификации бактериальных и грибковых возбудителей III-IV групп патогенности. Лабораторная служба, 2018, том 7, № 2, с. 78-86, <doi: 10.17116/labs20187278-86>, с. 81, столбец 2, строки 49-60	1
Y	RU 2541775 C2 (БИОМЕРЬЕ, ИНК.) 20.02.2015, с. 14, строки 43-44, с. 16, строки 22-27, с. 17, строки 34-40, с. 18, строки 43-48	1
A	MESTAS Javier и др. Direct identification of bacteria from positive BacT/ALERT blood culture bottles using matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. Diagnostic Microbiology and Infections Disease, 2014, Vol. 80, No. 3, pp. 193-196, <doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.07.008>, с. 193, столбец 2, строки 20-24, с. 194, столбец 1, строки 1-20	1

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

«Р» - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

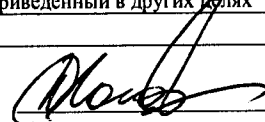
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других источниках

Дата проведения патентного поиска: **03/11/2020**

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

 Д.Ю. Рогожин