

КОГЕРЕНТНАЯ ФЛУКТУАЦИОННАЯ НЕФЕЛОМЕТРИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

А.С. Гурьев^{1,2}, О.Ю. Шалатова³, Е.В. Русанова¹, И.А. Василенко¹, А.Ю. Волков²

¹ ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

² ООО «Медтехнопарк», Москва, Россия

³ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В статье представлены данные по использованию метода когерентной флукуационной нефелометрии (КФН) в клинической микробиологической практике. Это новый оптический метод, позволяющий регистрировать рост микроорганизмов, начиная с низкой концентрации 5×10^3 КОЕ/мл. Метод дает возможность конструировать технически простые и надежные многоканальные анализаторы и использовать одноразовые кюветы низкого оптического качества, что имеет важное значение для удешевления анализов. КФН-анализатор позволяет решать ряд задач в клинической лабораторной диагностике — проводить быстрый скрининг биологических жидкостей и тест на чувствительность к антибактериальным препаратам. В работе представлены данные по применению прототипа КФН-анализатора для решения двух задач — скрининга мочи на бактериурию за 2–4 ч и определению чувствительность бактериальных культур к антибиотикам за 3–6 ч. Для подтверждения эффективности метода в общей сложности исследовано более 650 образцов мочи взрослых и детей в четырех лабораториях клинической микробиологии. Сравнивали результаты, полученные традиционными методами, при помощи КФН-анализатора и анализатора мочи UF-1000i (Sysmex). Показана полезность КФН-анализатора для предварительного отбора проб на анализ: метод позволяет быстро разделять отрицательные и положительные образцы, снижая общее количество исследований на 70–80%. В отличие от аналогов, КФН-анализатор позволяет одновременно исследовать кривые роста микроорганизмов, содержащихся в моче, и их начальную концентрацию; это дает возможность достигнуть высоких показателей чувствительности и специфичности (95,2 и 96,9% соответственно). Также проведено более 250 исследований чувствительности к антибиотикам бактериальных культур в двух лабораториях. Сравнивали результаты, полученные методом серийных разведений, диско-диффузионным методом и при помощи КФН-анализатора. Продемонстрирована эффективность КФН-анализатора для быстрого определения резистентных свойств как чистых клинических культур, так и микрофлоры мочи без выделения изолятов после быстрого подрашивания на КФН-анализаторе. Совпадение результатов с традиционными методами составило от 84 до 88%. Использование КФН-анализатора совместно с экспресс-методами видовой идентификации микроорганизмов (хромогенными питательными средами или масс-спектрометрическим методом) позволит проводить полный анализ мочи за 1–2 дня. В перспективе КФН-анализатор даст возможность проводить скрининг различных биологических жидкостей человека, а также найдет применение для решения широкого круга микробиологических задач, в том числе для ускорения и стандартизации санитарно-биологических исследований.

Ключевые слова: когерентная флукуационная нефелометрия, бактериурия, скрининг, моча, определение чувствительности к антибиотикам, микробиологический анализатор.

Адрес для переписки:

Гурьев Александр Сергеевич
129110, Россия, Москва, ул. Щепкина, 61/2, корп. 1,
ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.
Тел.: 8 (906) 062-06-73.
E-mail: coherneph@mail.ru

Contacts:

Alexander S. Gur'ev
129110, Russian Federation, Moscow, Shchepkina str., 61/2,
M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute
(MONIKI).
Phone: +7 (906) 062-06-73.
E-mail: coherneph@mail.ru

Библиографическое описание:

Гурьев А.С., Шалатова О.Ю., Русанова Е.В., Василенко И.А., Волков А.Ю.
Когерентная флукуационная нефелометрия в клинической
микробиологии // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 385–392.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-385-392

Citation:

Gur'ev A.S., Shalotova O.Yu., Rusanova E.V., Vasilenko I.A., Volkov A.Yu.
Coherent fluctuation nephelometry in clinical microbiology // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2,
pp. 385–392. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-385-392

COHERENT FLUCTUATION NEPHELOMETRY IN CLINICAL MICROBIOLOGY

Gur'ev A.S.^{a,b}, Shalatoва O.Yu.^c, Rusanova E.V.^a, Vasilenko I.A.^a, Volkov A.Yu.^b

^a Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation

^b Medtechnopark Ltd, Moscow, Russian Federation

^c Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. In this article data, concerning coherent fluctuation nephelometry (CFN) use in clinical microbiology is presented. CFN is a new optical method allowing to detect bacterial growth starting from low concentration 5×10^3 CFU/ml. Method also allows to construct technically simple and reliable analyzers and to use disposable cuvettes of low optical quality, which is important for reducing the cost of analyses. CFN-analyzer allows to solve several problems in clinical laboratory diagnostics — fast screening of biological liquids and antibiotic susceptibility test. In this work data concerning CFN-analyzer prototype using for solving two problems are presented, namely fast urine screening for bacteriuria within 2–4 hours and antibiotic susceptibility testing within 3–6 hours. Altogether more than 650 urine samples from adults and children were tested in four laboratories of clinical microbiology to confirm method effectiveness. The result obtained using classical methods, CFN-analyzer and urine analyzer UF-1000i (Sysmex) were compared. Usefulness of CFN-analyzer for preliminary selection of samples for further analysis was shown, method allows to separate negative and positive samples rapidly, reducing the number of urine analyses by 70–80%. Unlike analogs, CFN-analyzer allows to perform simultaneous analysis of growth curves and initial concentration of microorganisms, enabling to reach high sensitivity and specificity (95.2% and 96.9% respectively). Also more than 250 antibiotic susceptibility tests were performed in two laboratories. The results obtained using serial dilutions method, disk diffusion method and CFN-analyzer were compared. The effectiveness of CFN-analyzer was shown for determination of resistant properties of both pure cultures and urine microflora without isolation of bacteria. The agreement with traditional methods was from 84% to 88%. The use of CFN-analyzer together with express methods of identification of microorganisms (chromogenic nutrient broths or mass-spectrometry) allows to make full urine analysis within 1–2 days. In the future CFN-analyzer gives an opportunity to screen different human biological liquids, and finds an application for other microbiological tasks, including standardization and speeding-up in sanitary bacteriology.

Key words: coherent fluctuation nephelometry, bacteriuria, screening, urine antibiotic susceptibility testing, microbiology analyzer.

Введение

Несмотря на появление новых высокочувствительных технологий в последние 20 лет, культивирование микроорганизмов на плотных питательных средах по-прежнему остается основным методом клинической микробиологии [1]. Он позволяет выявить этиологический агент заболевания и определить его отношение к антибактериальным препаратам для подбора рациональной антибиотикотерапии. Это трудоемкий процесс, требующий большого спектра расходных материалов и значительных материальных затрат. Кроме того, результат исследования получают через 1–3 суток. Регистрация динамики роста микроорганизмов позволяет ускорить получение результата до нескольких часов. Внедрение современных методик, в том числе основанных на биофотонике, способствует устранению недостатков классических методов.

Фотометрия в клинической микробиологии

Фотометрические методы, основанные на регистрации мутности суспензии микроорганизмов, позволяют регистрировать динамику их роста и оперативно решать две важнейшие задачи — обнаруживать микроорганизмы в биологическом материале и определять их резистентные свойства [6]. Такие методы отличаются простотой и экономичностью, позволяют ускорить получение результата и повысить эффективность лабораторных исследований. Пучок света проходит через кювету с жидкостью и рассеивается

содержащимися в ней клетками, что позволяет по ослаблению интенсивности прошедшего света оценивать концентрацию микроорганизмов; такой метод называется турбидиметрией (лат. turbidus — мутный), он был впервые описан в 1874 г. Метод широко используется в настольных лабораторных денситометрах (турбидиметрах) для оценки концентрации бактерий по МакФарланду в суспензиях в интервале концентраций 3×10^7 — 5×10^9 КОЕ/мл (колониеобразующих единиц на мл) [11]. Технически сложные турбидиметры могут достигать чувствительности 10^6 КОЕ/мл [9], что все равно недостаточно для регистрации низких концентраций бактерий в биологическом материале.

Для регистрации низких мутностей предпочтительно использование нефелометрии (греч. *perhele* — облако), в которой регистрируется не прошедший через кювету пучок излучения, а свет, рассеянный микроорганизмами. Метод впервые описан в 1894 г. Интересно, что широкое распространение нефелометрия получила благодаря Джозефу МакФарланду, предложившему в 1907 г. использовать ее для оценки концентрации бактерий в суспензиях и разработавшем серию стандартов мутности, носящих его имя, которые применяются до сих пор.

При использовании нефелометрии свет рассеивается не только бактериями в кювете, но также и всеми частями оптического канала прибора, и в первую очередь самой кюветой. Даже в специальных условиях, позволяющих исключить рассеяние на стенках кюветы, чувствительность ме-

тогда составляет $2,5 \times 10^4$ КОЕ/мл, что можно считать практическим пределом для традиционной нефелометрии [10]. Чувствительность лабораторных нефелометров обычно лежит в диапазоне 10^5 – 10^6 КОЕ/мл, причем для обеспечения хорошей обнаружительной способности необходимо использовать анализаторы сложного устройства и кюветы высокого качества. А поскольку в микробиологии кюветы должны быть стерильными и одноразовыми, высокое оптическое качество негативно сказывается на стоимости проводимого анализа. Другая причина недостаточной чувствительности нефелометрии при регистрации суспензии микроорганизмов состоит в том, что для уменьшения влияния паразитных засветок рассеянный свет обычно регистрируют под большими углами 30° – 90° , а бактерии большую часть света рассеивают под малыми углами, менее 10° .

Фотометрические методы позволяют не только оценивать концентрацию микроорганизмов, но также регистрировать динамику их роста. Несмотря на ограниченную чувствительность, нефелометрия используется в микробиологических анализаторах HB&L (Alifax S.p.a., Италия) и 216Dx UTI System (BacterioScan Inc, США), ориентированных на исследование обсемененности различных биологических жидкостей человека [6]. Одна из задач, которую они позволяют решить, — скрининг мочи на бактериурию с целью разделить положительные образцы (содержащие $\geq 10^4$ КОЕ/мл возбудителя и требующие дальнейшего анализа) и отрицательные (стерильные или содержащие транзитную ассоциативную флору). Поскольку в практической лабораторной диагностике 70–80% образцов мочи не дают роста, проведение такого рода исследований может иметь большое экономическое значение. Для проведения такого анализа образец мочи смешивается питательным бульоном и инкубируется при 35°C в приборе в течение 2–4 ч. Возможность разделить положительные и отрицательные образцы основана на том, что культивирование происходит непосредственно в образце мочи, к которому возбудитель уже адаптирован и начинает расти сразу, поэтому его рост обнаруживается быстро (за 2–4 ч в зависимости от порога обнаружения). В свою очередь, контаминирующим микроорганизмам требуется несколько часов на адаптацию к новой среде, и поэтому их рост наблюдается значительно позже.

Анализаторы, основанные на традиционной нефелометрии, не обладают достаточной чувствительностью, чтобы исследовать начальную концентрацию микроорганизмов в образце мочи по его мутности; они анализируют только задержку начала роста. Существуют анализаторы предназначенные для скрининга мочи по концентрации микроорганизмов (проточная цитометрия), однако они не могут регистрировать

микробный рост (UF-1000i, Sysmex, Япония). Анализаторы обоих типов полезны для предварительного отбора образцов мочи на посев [5].

Вторая задача, которую позволяют решать нефелометрические анализаторы, это быстрый тест на чувствительность к антибиотикам. Регистрация динамики роста микроорганизмов в присутствии антибиотиков позволяет быстро получить информацию об их резистентных свойствах за 3–6 ч.

Новые возможности по ускорению анализов, проводимых в лабораториях клинической микробиологии, открываются с использованием масс-спектрометрии, которая позволяет не только быстро идентифицировать чистые культуры микроорганизмов, но и определять возбудителя непосредственно в биологических жидкостях [5]. Сочетание нефелометрического анализатора и масс-спектрометра является эффективным инструментом, дающим возможность проводить полный анализ мочи и получать информацию для назначения антибиотикотерапии в день поступления биоматериала на исследование.

На рынке медицинского оборудования отсутствуют отечественные фотометрические микробиологические анализаторы. Зарубежные нефелометрические системы, несмотря на их эффективность в клинической микробиологии, используются в единичных лабораториях из-за высокой стоимости приборов и расходных материалов.

Возможности когерентной флукуационной нефелометрии

Новый отечественный нефелометрический метод (когерентная флукуационная нефелометрия — КФН) лишен многих недостатков традиционной нефелометрии. В КФН также регистрируется рассеянный микроорганизмами свет. При этом измеряется не средняя интенсивность рассеянного света, а ее флукуации во времени (которые в традиционной нефелометрии считаются помехами и игнорируются). В результате итоговый сигнал определяется только микроорганизмами, а паразитные засветки от кюветы игнорируются.

Метод КФН позволяет легко достичь чувствительности 10^4 КОЕ/мл [4], которая ограничивается мутностью самих питательных бульонов. При этом одноразовые кюветы, используемые для анализа, могут быть низкого оптического качества. Микробиологический КФН-анализатор реализован в формате простого многоканального прибора, в котором регистрация бактериального роста производится одновременно во всех кюветах, а механика, обеспечивающая подачу кювет в измерительный канал (например, типа карусель), отсутствует. Это упрощает конструкцию и повышает надежность прибора.

Целью проведенных исследований является демонстрация эффективности разработанно-

го КФН-анализатора для быстрого скрининга мочи на бактериурию и экспресс-определения чувствительности бактериальных культур к антибиотикам.

Материалы и методы

В проведенных исследованиях использованы разработанные отечественные КФН-микробиологические анализаторы (12-канальные анализаторы «КФН-12», ООО «Медтехнопарк»), рассчитанные на использование стандартных фотометрических пластиковых полумикрокювет объемом 1 мл, которые закрываются резиновыми пробками. В приборах совмещены методы КФН и турбидиметрии, что позволяет расширить динамический диапазон измеряемых концентраций бактерий до 5×10^3 — 5×10^9 КОЕ/мл.

Высокая чувствительность дает возможность проводить скрининг мочи на КФН-анализаторе двумя способами. Первый основан на исследовании кривых роста, когда анализируется время задержки роста после начала инкубации пробы в питательном бульоне. Второй способ основан на определении концентрации микроорганизмов в моче, которая оценивается по начальной мутности образца (рис. 1). Кювету со смесью

мочи и бульона (0,5 + 0,5 мл) помещают в прибор и регистрируют начальную мутность и кривые роста течение 2–4 ч в зависимости от выбранного порога чувствительности.

Для определения чувствительности бактериальной культуры к антибиотикам используется по одной или по две кюветы с антибиотиком в одной или двух концентрациях, определяемых пограничной МПК (минимальной подавляющей концентрацией) в соответствии со стандартом, используемым в данной лаборатории. Также используется одна контрольная кювета (в которой содержится суспензия бактерий в бульоне без антибиотика). Кривые роста в присутствии антибиотиков сравнивают с контрольной кривой. В случае наличия чувствительности к антибиотикам наблюдается подавление роста (рис. 2). Время анализа составляет от 3 до 6 ч для различных антибиотиков.

Результаты, полученные на КФН-анализаторе, сравнивали с результатами, полученными классическими методами, которые принимали за эталон. Для определения диагностической полезности методов рассчитывали следующие диагностические индикаторы: чувствительность, специфичность, позитивное прогностическое значение, негативное прогностическое значение,

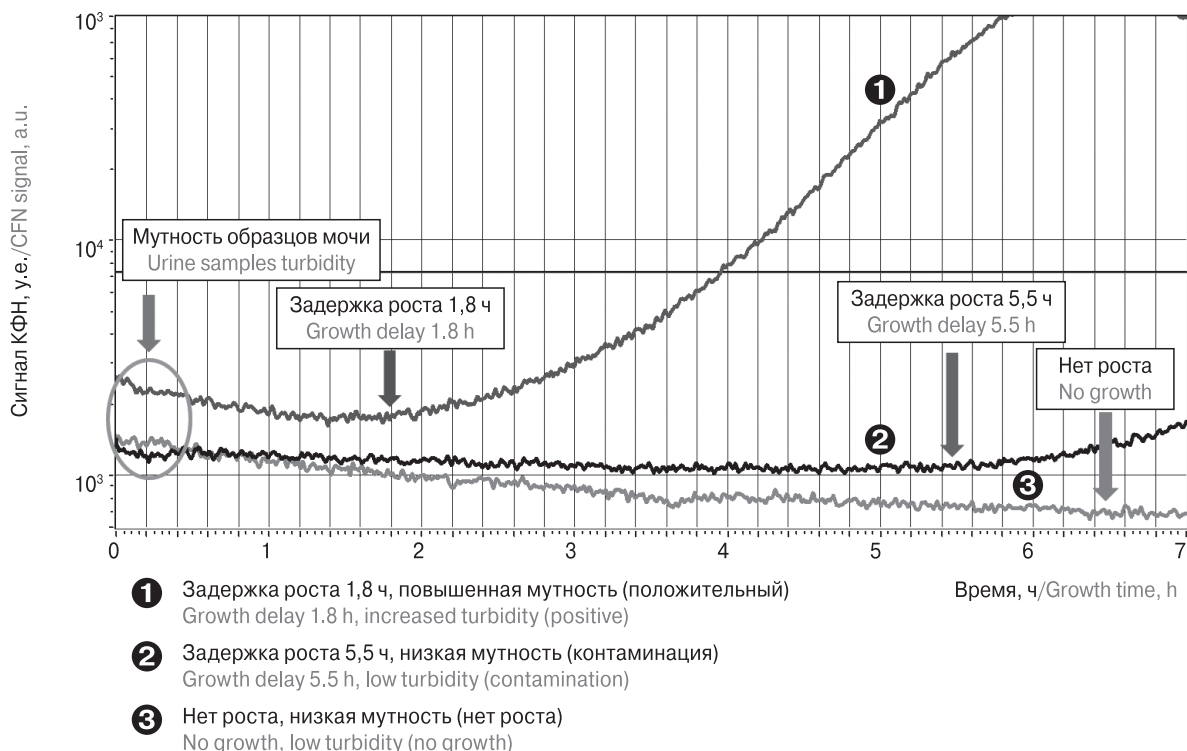


Рисунок 1. Пример кривых роста на КФН-анализаторе для трех образцов мочи — содержащего возбудитель в значимой концентрации, содержащего транзитную ассоциативную флору (посторонние загрязнения) и не содержащего микроорганизмов. Разделение положительных и отрицательных образцов проводят по двум параметрам — задержки роста и начальной мутности
 Figure 1. Representative growth curves for three urine samples in CFN-analyzer: pathogen at clinically relevant concentration, transient associated microflora (contamination), lacking microflora. Positive and negative samples were identified based on growth delay time and baseline sample turbidity

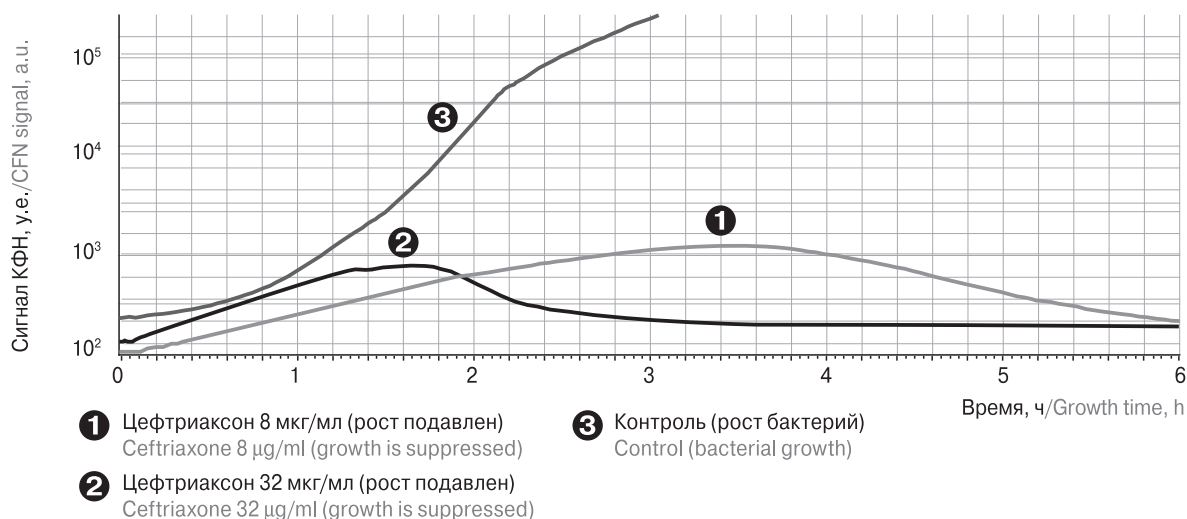


Рисунок 2. Кривые роста для чувствительного к цефтриаксону клинического изолята *E. coli* на КФН-анализаторе

Figure 2. Growth curves for ceftriaxone-sensitive *E. coli* clinical isolate in CFN-analyzer

положительное отношение правдоподобия, негативное отношение правдоподобия, диагностическое отношение шансов, а также использовали ROC-анализ [8].

Результаты и обсуждение

Опыт использования когерентной флукуационной нефелометрии для скрининга мочи

Нами исследовано более 650 образцов мочи взрослых и детей. С этой целью одновременно проводился посев на стандартные плотные питательные среды и исследование на КФН-анализаторе. Анализ образца на приборе проводили двумя способами. В первом способе анализировали задержку микробного роста, во втором — начальную концентрацию микроорганизмов в исследуемых пробах. Во всех исследованиях результаты посева на плотные среды принимали за эталон.

Скрининг 119 образцов мочи взрослых [2] показал наличие роста в 19,3% проб при посеве на плотные питательные среды. Аналогичные результаты были получены при исследовании задержки роста на КФН-анализаторе. Сравнение результатов, полученных обоими методами, показали диагностическую информативность скрининга на приборе: чувствительность — 91%, специфичность — 90%.

Скрининг 205 образцов мочи детей [3] при посеве на плотные питательные среды выявил положительный результат в 26,8% проб. Результаты анализа задержки роста на КФН-анализаторе были аналогичными; при сравнении с результатами посева, диагностическая информативность скрининга на приборе составила: чувствительность — 95%, специфичность — 85%.

При исследовании начальной концентрации микроорганизмов в 208 образцах мочи взрослых на КФН-анализаторе [2] и при параллельном посеве на плотные питательные среды выявили 31,7% положительных проб. В сопоставлении результатов, диагностическая информативность скрининга на приборе составила: чувствительность — 91%, специфичность — 46%.

Таким образом, проведенные исследования показали, что КФН-анализатор является эффективным инструментом, позволяющим осуществлять предварительный отбор образцов мочи на посев, выделяя положительные образцы для дальнейшего исследования, и исключая отрицательные образцы. При этом способ исследования мочи при помощи анализа кривых роста оказался более информативным, чем способ, основанный на анализе концентрации микроорганизмов в пробе. Очевидно, что максимальная эффективность скрининга мочи может быть достигнута при одновременном анализе мутности образца и роста микроорганизмов в нем.

Валидация метода исследования на отечественном КФН-анализаторе проводилась в сравнении с зарегистрированным на отечественном рынке анализатором UF-1000i. Исследования проводились на 117 образцах мочи детей с инфекцией мочевыделительной системы [8], 18% были положительны по результатам посева на плотные среды. Результаты тестирования на КФН-анализаторе одновременно обоими способами (по кривым роста и концентрации микроорганизмов) и на UF-1000i только по концентрации микробов сравнивали с результатами посева на плотные питательные среды, которые принимали за эталон (100%). Для обоих анализаторов выбирали уровень cut-off, в соответствии с которым рассчитывали показатели диагностической

Таблица 1. Показатели диагностической информативности скрининга мочи на бактериурию на UF-1000i и КФН-анализаторе

Table 1. Parameters of diagnostic informative value bacteriuria screening by using UF-1000i and CFN-analyzer

Показатель Parameter	UF-1000i	КФН-анализатор CFN-analyzer
Чувствительность, % Sensitivity, %	95,2	95,2
Специфичность, % Specificity, %	82,3	96,9
Позитивное прогностическое значение, % Positive predictive value, %	54,1	87
Негативное прогностическое значение, % Negative predictive value, %	98,9	98,9
АUC в ROC-анализе (больше — лучше) AUC in ROC-analysis (higher values match better result)	0,949	0,987
Позитивное отношение правдоподобия (больше — лучше) Positive likelihood ratio (higher values match better result)	5,4	30,5
Негативное отношение правдоподобия (меньше — лучше) Negative likelihood ratio (lower values match better result)	0,058	0,049
Диагностическое отношение шансов (больше — лучше) Diagnostic odds ratio (higher values match better result)	43,2	81,7
Доля исключенных из дальнейшего анализа образцов, % Percentage of samples excluded from further analyses, %	68,4	80,3

информативности скрининга, чтобы достичь максимального совпадения с посевом (табл. 1).

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что совместный анализ концентрации микроорганизмов и роста микрофлоры в образце мочи на КФН-анализаторе является более эффективным, чем анализ только одного из параметров.

Опыт использования когерентной флукуационной нефелометрии для определения чувствительности к антибиотикам

Для демонстрации возможности определения резистентных свойств бактерий на КФН-анализаторе выполнено 2 исследования. В общей сложности проведено более 250 определений чувствительности бактериальной культуры к конкретному антибиотику.

В первом исследовании тестировали отношение к антибиотикам 18 клинических изолятов бактерий (*E. coli* — 7 шт., *S. aureus* — 5 шт., *E. faecium* — 2 шт., *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis* — по 1 шт.) параллельно тремя методами — методом серийных разведений (МСР), диско-диффузионным методом (ДДМ) и на КФН-анализаторе [7]. Были использованы 5 антибиотиков (амоксиклав, цефепим, цефтриаксон, цефуоксим, ципрофлоксацин). Сравнение полученных результатов представлено в таблице 2.

Очевидно, что все результаты, полученные при помощи «золотого стандарта» МСР, рутинного ДДМ и на КФН-анализаторе, сравнимы, из чего можно сделать вывод о схожей диагностической информативности всех трех методов. Наилучшее совпадение результатов получено при сравнении показателей, полученных ДДМ (используемым в практическом здравоохранении) и на приборе. При этом время, необходимое для определения чувствительности к антибиотикам на КФН-анализаторе составляет 3–6 ч в сравнение с 20 ч для ДДМ, что дает воз-

Таблица 2. Соотношение результатов чувствительности к антибиотикам клинических изолятов бактерий, полученных ДДМ, МСР и на КФН-анализаторе

Table 2. Comparison of the results of clinical isolate antibiotic sensitivity obtained by disk-diffusion method (DDM), serial dilution method (SDM), and CFN-analyzer

Сравнение методов попарно Pairwise results comparison	КФН — ДДМ CFN — DDM	КФН — МСР CFN — SDM	МСР — ДДМ DDM — SDM
Совпадение, % Agreement, %	84,6	84,3	74,6
Малое расхождение, % (R — I или S — I) Minor error, % (R — I or S — I)	11,5	9,6	11,3
Несовпадение, % (R — S) Mismatch, % (R — S)	3,8	6,0	14,1
Сравнение результатов трех методов КФН — ДДМ — МСР Comparison of results obtained by the methods examined: CFN — DDM — SDM			
Совпадение, % Agreement, %	70,0	Несовпадение, % Mismatch, %	30,0

возможность получать результат непосредственно в день проведения исследования.

Возможность ускоренного скрининга резистентных свойств бактерий непосредственно в биологической жидкости без их идентификации может быть актуальным в экстренных случаях у крайне тяжелых реанимационных пациентов. Для оценки такой возможности было проведено второе исследование, в котором мы определяли чувствительность культур бактерий в образцах мочи пациентов с бактериурией после их подращивания на КФН-анализаторе (в течение 1 ч) без выделения изолятов [7]. Было исследовано 182 пробы мочи пациентов, находящихся в урологической клинике, на наличие инфекции на КФН-анализаторе (аналогично работам [2, 3]), для валидации метода использовали посев на плотные среды. Для анализа был отобран 21 положительный образец, в котором регистрировался микробный рост в течение 1 ч на приборе. Результат первичного посева на плотные среды выявил наличие роста во всех отобранных пробах (5 штаммов *E. coli*, 4 штамма *E. faecalis*, по 3 штамма *S. haemolyticus*, *K. pneumoniae*, *E. faecium*, *A. baumannii* и 1 штамм *S. aureus*), причем в одном из образцов было высеяно 2 возбудителя. Чувствительность культур в пробе мочи, определенную на КФН-анализаторе, сравнивали с чувствительностью соответствующих изолятов, определенной ДДМ. Резистентные свойства двухкомпонентной ассоциации в пробе мочи для каждого антибиотика определялась по наиболее резистентному возбудителю. Микрофлору каждого из 21 образцов исследовали на чувствительность к 9–10 антибиотикам, всего проведено 196 исследований параллельно ДДМ и на КФН-анализаторе. Выбор набора антибиотиков определялся штаммом микроорганизма. При исследовании чувствительности микрофлоры мочи на приборе, отобранные образцы мочи использовали в качестве инокулята без выделения изолятов и типирования микроорганизмов. Всего было использовано 13 антибиотиков (амоксиклав, цефтазидим, цефтриаксон, цефоперазон, цефепим, цефазолин, имипинем, рифампицин, доксициклин, амикацин, офлоксацин, цiproфлоксацин, ванкомицин). Чувствительность, определенную на КФН-анализаторе, сравнивали с результатами исследования соответствующих изолятов при помощи ДДМ (табл. 3).

Таким образом, на КФН-анализаторе можно определять отношение к антибиотикам не только бактериальных изолятов, но микрофлоры мочи без выделения чистой культуры. При этом в случае многокомпонентной микробной ассоциации в пробе чувствительность ассоциации определяется наиболее резистентным возбудителем (в случае, если хотя бы один из возбудителей устойчив к данному антибиотику,

Таблица 3. Соотношение результатов чувствительности к антибиотикам микрофлоры мочи, полученных ДДМ и на КФН-анализаторе

Table 3. Comparison of urine microflora antibiotic susceptibility analyzed by disk-diffusion method (DDM) and CFN-analyzer

Вариант соотношения Comparison variant	%
Совпадение Agreement	87,8
Малое расхождение (R – I или S – I) Minor error (R – I or S – I)	8,2
Пропущенная чувствительность (КФН – R, ДДМ – S) Major error (missed sensitivity) (CFN – R, DDM – S)	3,6
Пропущенная резистентность (КФН – S, ДДМ – R) Very major error (missed resistance) (CFN – S, DDM – R)	0,5

то ассоциация считается устойчивой к этому антибиотику). Прибор позволяет выявлять те антибиотики, к которым чувствительны все возбудители в пробе мочи. В тандеме с MALDI-TOF масс-спектрометрией КФН-анализатор позволяет проводить полный анализ мочи за один рабочий день без изоляции чистой культуры возбудителя.

Заключение

Развитие перспективных технологий открывает новые горизонты для клинической микробиологии, однако на сегодняшний день культивирование остается ведущим методом в практической лабораторной диагностике инфекций. Для ускорения процесса регистрации роста культур применяют нефелометрические анализаторы. Исследования показали, что новый отечественный метод — когерентная флуориметрия — позволяет проводить скрининг мочи на бактериурию и определение чувствительности к антибиотикам, обеспечивая при этом быстроту проведения исследований, максимальную диагностическую и экономическую эффективность. В тандеме с экспресс-методами видовой идентификации микроорганизмов (хромогенными питательными средами или масс-спектрометрией) метод дает возможность проводить полный анализ мочи за 1–2 дня. В перспективе КФН-анализатор даст возможность проводить скрининг различных биологических жидкостей человека, ускорить и стандартизировать санитарно-бактериологические исследования, а также анализировать бактерицидные свойства сыворотки крови для контроля за проводимой антибиотикотерапией.

Список литературы/References

1. Баранов А.А., Маянский А.Н., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Новая эпоха в медицинской микробиологии // Вестник Российской Академии наук. 2015. Т. 85, № 6. С. 907–909. [Baranov A.A., Mayanskii A.N., Chebotar' I.V., Mayanskii N.A. A new epoch in medical microbiology. *Vestnik Rossiyskoy Akademii nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, vol. 85, no. 6, pp. 515–122. doi: 10.1134/S1019331615060015 (In Russ.)]
2. Гурьев А.С., Волков А.Ю., Долгушин И.И., Поспелова А.В., Растопов С.Ф., Савочкина А.Ю., Сергиенко В.И. Когерентная флукуационная нефелометрия — быстрый метод скрининга мочи на микробную обсемененность // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 159, № 1. С. 120–123. [Gur'ev A.S., Volkov A.Y., Dolgushin I.I., Pospelova A.V., Rastopov S.F., Savochkina A.Yu., Sergienko V.I. Coherent fluctuation nephelometry: a rapid method for urine screening for bacterial contamination. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015, vol. 159, no. 1, pp. 107–110. doi: 10.1007/s10517-015-2902-0 (In Russ.)]
3. Гурьев А.С., Кузнецова О.Ю., Пясецкая М.Ф., Смирнова И.А., Беляева Н.А., Вербов В.Н., Волков А.Ю. Быстрый скрининг мочи на бактериурию у детей с использованием микробиологического анализатора, совмещающего в себе методы фотометрии и когерентной флукуационной нефелометрии // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 395–398. [Gur'ev A.S., Kuznetsova O.Yu., Pyasetskaya M.F., Smirnova I.A., Belyaeva N.A., Verbov V.N., Volkov A.Yu. Rapid urine screening for bacteriuria in children using microbiology analyzer, combining photometric and coherent fluctuation nephelometric methods. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 395–398. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-395-398 (In Russ.)]
4. Растопов С.Ф. Когерентная флукуационная нефелометрия: высокочувствительный метод детектирования частиц в жидкости // Приборы и техника эксперимента. 2011. Т. 54, № 6. С. 95–99. [Rastopov S.F. Coherent fluctuation nephelometry: a high-sensitivity method for detecting particles in liquids. *Pribory i tekhnika eksperimenta = Instruments and Experimental Techniques*, 2011, vol. 54, no. 6, pp. 837–840. doi: 10.1134/S0020441211060194 (In Russ.)]
5. Станкевич Л.И., Герасимова Е.С., Загорельский В.В. Скрининг бактериурии с помощью автоматизированной проточной цитометрии на анализаторе UF1000i Sysmex как инструмент для отбора образцов мочи на посев // Поликлиника. 2014. Т. 4, № 1. С. 13–16. [Stankevich L.I., Gerasimova E.S., Zagorelskiy V.V. Screening of bacteriuria by an automated flow cytometry analyzer UF1000i Sysmex as an instrument for selection of urine samples for culturing. *Poliklinika = Policlinics*, 2014, vol. 4, no. 1, pp. 13–16 (In Russ.)]
6. Davenport M., Mach K.E., Shortliffe L.M.D., Banaei N., Wang T.H., Liao J.C. New and developing diagnostic technologies for urinary tract infections. *Nat. Rev. Urol.*, 2017, vol. 14, no. 5, pp. 296–310. doi: 10.1038/nrurol.2017.20
7. Gur'ev A.S., Kuznetsova O.Yu., Kraeva L.A., Rastopov S.F., Verbov V.N., Vasilenko I.A., Rusanova E.V., Volkov A.Yu. Development of microbiological analyzer based on coherent fluctuation nephelometry. In: *Advances in artificial systems for medicine and education*. Eds. Hu Z., Petoukhov S., He M. Springer, 2018, vol. 658, pp. 198–206. doi: 10.1007/978-3-319-67349-3_18
8. Gur'ev A.S., Yudina I.E., Lazareva A.V., Volkov A.Yu. Coherent fluctuation nephelometry as a promising method for diagnosis of bacteriuria. *Pract. Lab. Med.*, 2018, vol. 12: e00106. doi: 10.1016/j.plabm.2018.e00106
9. Maia M.R., Marques S., Cabrita A.R., Wallace R.J., Thompson G., Fonseca A.J., Oliveira H.M. Simple and versatile turbidimetric monitoring of bacterial growth in liquid cultures using a customized 3D printed culture tube holder and a miniaturized spectrophotometer: application to facultative and strictly anaerobic bacteria. *Front. Microbiol.*, 2016, no. 7, pp. 1381. doi: 10.3389/fmicb.2016.01381
10. U.S. EPA. Detection of biological suspensions using online detectors in a drinking water distribution system simulator. *U.S. Environmental Protection Agency*, 2010, EPA/600/R-10/005
11. Zapata A., Ramirez-Arcos S. A comparative study of McFarland turbidity standards and the Densimat photometer to determine bacterial cell density. *Curr. Microbiol.*, 2015, vol. 70, no. 6, pp. 907–909. doi: 10.1007/s00284-015-0801-2

Авторы:

Гурьев А.С., PhD, старший научный сотрудник ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт (МОНКИ) им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия; научный сотрудник ООО «Медтехнопарк», Москва, Россия;
Шалатова О.Ю., младший научный сотрудник лаборатории биопрепаратов Отдела новых технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Русанова Е.В., к.м.н., ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории лабораторного отдела ГБУЗ МО МОНКИ им. М.Ф. Владимирского, главный внештатный бактериолог МЗ МО России, Москва, Россия;
Василенко И.А., д.м.н., профессор, зав. научно-исследовательской лабораторией лабораторного отдела ГБУЗ МО МОНКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия;
Волков А.Ю., к.ф.-м.н., генеральный директор ООО «Медтехнопарк», Москва, Россия.

Authors:

Gur'ev A.S., PhD, Senior Researcher, Research Laboratory, M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Clinical and Research Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation; Researcher, Medtechnopark Ltd., Moscow, Russian Federation;
Shalatova O.Yu., Junior Researcher, Laboratory of Biopreparations, Innovative Technologies Department, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Rusanova E.V., MD, PhD, Lead Researcher, Research Laboratory, M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Clinical and Research Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation; Chief Supernumerary Specialist in Bacteriology, Department of Healthcare of the Moscow Region, Moscow, Russian Federation;
Vasilenko I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Research Laboratory, M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Clinical and Research Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation;
Volkov A.Yu., PhD (Physics and Mathematics), Director of Medtechnopark LTD, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.04.2018
 Отправлена на доработку 11.03.2019
 Принята к печати 12.04.2019

Received 24.04.2018
 Revision received 11.03.2019
 Accepted 12.04.2019