

DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s1-49-53

Цитирование: Дмитриева Н.В., Агинова В.В., Петухова И.Н., Григорьевская З.В., Багирова Н.С. Автоматизация микробиологической лаборатории — путь к снижению летальности онкологических больных. Злокачественные опухоли 2020; 3s1: 49–53

АВТОМАТИЗАЦИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ — ПУТЬ К СНИЖЕНИЮ ЛЕТАЛЬНОСТИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Н.В. Дмитриева¹, В.В. Агинова², И.Н. Петухова¹, З.В. Григорьевская¹, Н.С. Багирова¹

1. ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

2. ГБПОУ ДЗМ «Медицинский колледж №6», Москва, Россия

Для корреспонденции: prof.ndmitrieva@mail.ru

Резюме: Онкологические больные являются группой риска в отношении возникновения внутри-и внебольничных инфекций вследствие ряда факторов. Автоматизация микробиологической лаборатории позволяет снизить частоту ошибок, связанных с человеческим фактором, ускорить выдачу антибиотикограммы и своевременно начать антибиотикотерапию, что приведет к снижению летальности и повышению качества жизни пациентов.

Ключевые слова: автоматизация микробиологической лаборатории, онкологические больные, лекарственная устойчивость

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические и особенно онкогематологические больные вследствие иммунодефицита, вызванного самим заболеванием или проводимой цитостатической или лучевой терапией, являются группой высочайшего риска возникновения инфекционных осложнений [1, 2, 3]. Этому способствуют кахексия, опухолевая интоксикация, анемия, большой объем кровопотери при оперативных вмешательствах, использование глюкокортикоидов, миелосупрессия и другие факторы. Анализ причин смерти онкологических больных выявил, что инфекционные осложнения являлись причиной смерти по данным 28,6–32,0% аутопсий. Однако, ряд инфекционных осложнений остаются нераспознанными, чему свидетельствует тот факт, что при анализе результатов аутопсии данный показатель может достигать 50% [4]. В целях ограничения возникновения инфекционных осложнений и распространения антимикробной резистентности к настоящему времени проведена большая работа, включающая изучение механизмов возникновения антимикробной резистентности и системный мониторинг ее распространения, создание специальных служб, контролирующих стационары, расширение перечня и актуализация различных противоэпидемических мероприятий, обеспечение межведомственных взаимодействий по вопросам предотвращения возникновения нозокомиальных инфекций и пр. [5].

Однако, несмотря на проводимые мероприятия, люди продолжают умирать от инфекций, вызванных, в первую очередь резистентными госпитальными штаммами ми-

кроорганизмов. Только по официальным данным нозокомиальные инфекции в России переносят ежегодно 40–60 тыс. человек [6].

По мнению многих специалистов, необходимы глубокие изменения в стратегии борьбы с нозокомиальными инфекциями, которые могут повлиять на сложившуюся ситуацию. Очевидно, наряду с совершенствованием противоэпидемических мероприятий следует обратить внимание и на клиничко-микробиологический аспект этой проблемы.

В настоящее время убедительно доказано, что нерациональная антибиотикотерапия способствует формированию резервуаров мультирезистентных госпитальных штаммов с повышенными вирулентными свойствами, бороться с которыми становится все труднее по мере развития эпидемического процесса. В то же время очень сложно оценить динамику распространения резистентности среди различных госпитальных штаммов в больницах не только Москвы, но и России в целом.

Наиболее часто этиологическими агентами нозокомиальных инфекций становятся бактерии группы ESKAPE, которая включает в себя ряд бактерий, обладающих множественной (MDR) и экстремальной (XDR) лекарственной устойчивостью, таких как: кишечная палочка, золотистый стафилококк, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, синегнойная палочка, энтерококки [7, 8, 9, 10, 11].

Однако, не только высоко-и множественно резистентные возбудители нозокомиальных инфекций увеличивают летальность и влияют на финансовые затраты клиники, но и своевременное начало адекватной антибиотикотерапии, независимо от того идет ли речь о бактериальной или

Инфекции в онкологии

грибковой инфекции. Своевременно начатая адекватная антибиотикотерапия инфекций достоверно снижает летальность при сравнении с неадекватной терапией или с адекватной, но начатой отсрочено.

Поэтому, разработка новейших различных автоматических микробиологических анализаторов, позволяющих получить идентификацию «чистой» культуры в течение нескольких минут, а антибиотикограмму в течение 16–24 часов, в первую очередь направлена на ускорение получения результатов микробиологических анализов, доведение результатов до сведения лечащего врача, что, в конечном итоге, приведет к снижению летальности и улучшению качества жизни онкологических пациентов [12].

Целью данного обзора является показать преимущество использования автоматизированных систем для микробиологических исследований, позволяющих в минимальные сроки идентифицировать возбудителей инфекционных заболеваний, определить их лекарственную чувствительность, а также выявить мутации в генетическом аппарате возбудителей нозокомиальных инфекций, позволяющие сделать прогноз о резистентности.

Основным преимуществом микробиологических исследований в общей системе клинической лабораторной службы следует считать то, что их результаты могут иметь важное, а нередко и жизненно важное значение не только для того пациента, у которого они проводились, но и для окружающих больных в палате, отделении и в стационаре в целом.

С точки зрения госпитальной эпидемиологии часто имеет значение не столько клиническая выраженность осложнений микробной этиологии у данного конкретного больного, сколько некоторые клинически значимые биологические свойства штамма-возбудителя. Это и множественная лекарственная устойчивость (полирезистентность) штаммов грамотрицательных бактерий, и устойчивость к метициллину (оксациллину) стафилококков или устойчивость к ванкомицину энтерококков. Важнейшим признаком эпидемиологического неблагополучия в данном конкретном стационаре является длительная циркуляция подобных штаммов микроорганизмов, что может спровоцировать вспышку внутрибольничной инфекции. Отсюда следует, что бактериологические исследования в стационаре должны проводиться у всех пациентов с признаками заболевания микробной этиологии [13].

Эта специфика микробиологических исследований определяет три основных направления деятельности клинической микробиологической лаборатории в любом стационаре:

1. Исследование биологического материала от больных с признаками инфекционного заболевания.
2. Проведение санитарно-микробиологических исследований внутрибольничной среды.
3. Оценка эпидемиологической ситуации в отделениях стационара на основе анализа результатов микробиологических исследований биологического материала

от больных за определенный период времени, а также данных, полученных при санитарно-микробиологических исследованиях отделений за тот же период времени.

Большое количество ручного труда, без которого не может существовать микробиологическая лаборатория, влияет не только на финансовые затраты клиники, но и на скорость проведения анализов, а также и на частоту встречаемости ошибок внутрилабораторного этапа исследований, которые, прежде всего, обусловлены человеческим фактором.

Поэтому, автоматизация микробиологических исследований, применение микробиологических анализаторов, позволяет значительно сократить время получения безошибочных результатов анализа, что, в свою очередь, дает возможность лечащему врачу в кратчайшие сроки назначать рациональную антибиотикотерапию, что приведет к снижению летальности и улучшению качества жизни пациентов.

В большинстве лабораторий микробиологии сохранена ручная работа практически на всех этапах проведения анализа. Так, при получении биологического материала производится первичный посев на питательные среды, согласно Приказу Министерства здравоохранения СССР от 22 апреля 1985 г. № 535 [14]. Данный вид исследований производится вручную техникой штрихового посева. Посев исследуемого материала — очень ответственный и трудоемкий процесс. Квалификация медицинского персонала должна быть достаточно высокой, чтобы произвести посев, а затем, выделить «чистую» культуру. Существующие принципы выделения «чистой» культуры, основанные на технике штрихового посева по Дригальскому или методе серийных разведений являются крайне трудоемкими, требует больших экономических и временных затрат, что в условиях практической лаборатории не осуществимо. Что касается метода штрихового посева — он является наиболее распространенным в подавляющем большинстве лабораторий и направлен на получение отдельных колоний микроорганизмов. По статистике, самый большой процент ошибок внутрилабораторного этапа исследований приходится именно на этап первичного посева биологического материала и выделение чистой культуры микроорганизмов [15]. Прошло уже более 100 лет с того момента, когда Р. Кох впервые опубликовал работу «Методы изучения патогенных микроорганизмов», где предложил использовать плотную питательную среду для выращивания микроорганизмов. Штриховая линия вследствие ее ширины при получении роста нескольких культур сильно затрудняет выделение «чистой» культуры, возможен вариант ее «зарастания» микроорганизмами. Длина такой линии на чашке Петри составляет около 1 м. Современный уровень развития технологий позволяет автоматизировать самые сложные ручные процессы. Так, автоматическая посевная, роботизированная мультифункциональная платформа для микробиологических исследований BD Kiestra (Becton

Dickinson) обладает запатентованной технологией посева крутящимся магнитным шариком, что позволяет получить тонкую линию посева длиной около 10 м и снизить вероятность того, что какой-либо микроорганизм не будет увиден врачом-бактериологом. Кроме того, автоматическое перемещение «выросших» чашек Петри в термостат и управление посевом дистанционно с удаленного компьютера позволяет сократить количество дней на производство анализа путем маркировки нужных для посева колоний с удаленного доступа (например, в выходные дни или вечернее время).

Автоматизация позволяет: оптимизировать труд и освоить высококвалифицированный персонал от рутинной работы; уменьшить время работы с тестами и сократить сроки получения результатов; снизить влияние человеческого фактора, тем самым минимизировать количество ошибок при выполнении лабораторных исследований; повысить безопасность работы медперсонала, так как контакт с потенциально опасным биологическим материалом становится минимальным. Автоматизация дает возможность оценивать и контролировать состояние лабораторного процесса в режиме онлайн.

Автоматизированные микробиологические системы, предназначенные для обнаружения наличия микроорганизмов в клинических образцах крови (бактериемии и фунгемии) и других в норме стерильных жидкостей (например, микробиологические анализаторы BacT/Alert (bioMérieux), BacTec (Becton Dickinson) являются незаменимыми помощниками в современной клинике и позволяют в минимальные сроки от нескольких часов до 3–5 суток (в зависимости от количества микроорганизмов в крови) получить ответ. Необходимо отметить, что для достоверной диагностики сепсиса целесообразно провести исследование крови на содержание биомаркера прокальцитонина, повышение уровня которого свидетельствует о наличии бактериальной или грибковой инфекции [16]. Определение уровня прокальцитонина в крови проводят с помощью современного анализатора VIDAS (bioMérieux). Для исследования крови с помощью автоматизированных систем BacT/Alert, BacTec кровь собирают во флаконы с питательной средой. Существуют различные флаконы с питательными средами как универсальными, так и отдельно для роста аэробов, грибов и анаэробов. Универсальные среды позволяют выделять микроорганизмы из образцов разного типа, включая кровь и другие в норме стерильные биологические жидкости. Также разработаны стандартные и специализированные питательные среды с усиленной нейтрализацией антибиотиков (FAN Plus). Колориметрический метод детекции, применяемый в данных анализаторах, с использованием тщательно разработанных алгоритмов позволяют минимизировать количество ложно-отрицательных результатов. В некоторых системах флаконы для аэробов и грибов объединены. Автомат выполняет постепенную проверку флаконов на наличие микробной метаболической активности путем измерения уровней флуоресценции, излучаемой

специально разработанным детектором на дне флакона. Светодиодные индикаторы на передней панели прибора, а также светодиоды, расположенные над каждой позицией, предоставляют сведения о наличии или отсутствии роста микрофлоры во флаконе. Сорбент (латексные частицы) инактивирует антибиотики, что повышает вероятность выделения возбудителя и сокращает время детекции. Предельно простая схема работы с анализаторами требует минимального времени для обучения персонала и повышает производительность. Даже при условии отсроченной загрузки флаконов, визуальная оценка изменения цвета дна флакона позволяет предварительно идентифицировать положительный флакон даже до загрузки его в прибор. Таким образом, можно быть уверенным в точном и быстром выявлении микробного роста разных типов образцов.

Естественная среда обитания практически всех микроорганизмов способствует размножению различных комбинаций микроорганизмов. Однако для того чтобы установить этиологию заболеваний инфекционного характера посредством использования бактериологических методов, необходимо выделить «чистой» культуры. Далее выделенная культура рассеивается на ряд питательных сред (жидких и плотных), где определяют культуральные свойства микроорганизма. Биохимическую активность и метаболизм микроорганизмов изучают на дифференциально-диагностических средах. Одновременно определяют отношение микробов к кислороду и углекислоте, а также их гемолитическую активность. Антигенную структуру изучают при помощи различных серологических реакций. Все эти манипуляции, выполняемые вручную, требуют временных затрат, поэтому в прошлые десятилетия результат бактериологического анализа был доступен для врача спустя 7–10 дней. Идеальным решением для оснащения лаборатории, занимающейся клинической микробиологией и функциональной геномикой являются настольные MALDI-TOF масс-спектрометры серии Microflex™. Их отличают: высокая чувствительность, достоверное определение олигонуклеотидов и биомаркеров, подробный анализ малых молекул и полимеров, инновационная скорость и точность идентификации вида и рода микроорганизмов. Такая система оптимальна для решения основных задач лаборатории. Компактные настольные приборы работают в линейном режиме и обладают высокой производительностью. Устройство состоит из источника ионов, TOF-анализатора и азотного лазера. Введение в микробиологическую практику системы MALDI-TOF MS можно считать прорывом в микробиологии, так как позволяет за 5–10 минут (необходима «чистая» культура) идентифицировать микроорганизмы (бактерии или грибы) с минимальным количеством ошибок. Идентификация проводится по принципу «отпечатка пальцев» и основывается на сравнении полученных масс-спектров с масс-спектрами из баз данных. При этом следует учитывать отсутствие необходимости в расходных материалах, что является финансово выгодным для современной клиники [17].

Инфекции в онкологии

Введение в практику лабораторных исследований автоматизированных систем (Phoenix (Becton Dickinson), Vitek-2 (bioMerieux), MicroScan WalkAway (Beckman Coulter) и др.) позволяет в течение 18–24 часов получить антибиотикограмму с определением минимальных ингибирующих концентраций и их интерпретацией. Полностью закрытые системы безопасны для оператора и снижают риск перекрестной контаминации образцов.

Стратегической задачей здравоохранения является создание безопасной среды обитания для пациентов и персонала в организациях, осуществляющих медицинскую деятельность [18]. Автоматизация и стандартизация бактериологических исследований — один из способов реализации профилактических мероприятий, предусмотренных данным документом. Кроме того следует учитывать полное устранение человеческого фактора при проведении этих исследований и, как следствие, уменьшение связанных с этим частоты ошибок. С точки зрения трудозатрат, используя функциональный потенциал аппарата, можно повысить производительность лаборатории без увеличения числа персонала, а также нагрузки на персонал.

Современные требования к микробиологии диктуют необходимость не только определять чувствительность к антибиотикам, но и выявлять карбапенемазы бактерий. Автоматическая картриджная система GeneXpert предназначена для экспресс-диагностики инфекций методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Время получения результата составляет 30–60 минут. Анализатор позволяет проводить весь цикл этапов ПЦР в одном приборе, работает в режиме «по требованию» и проводит анализ для каждого отдельного пациента. В приборе полностью исключена возможность контаминации окружающих помещений и не требуется наличие 3-х индивидуальных комнат и специальной вентиляции. Система позволяет в режиме экспресс-анализа определять генетические маркеры карбапенем-резистентности патогенов, вызывающих инфекции бактериальной этиологии у пациентов. Предполагается детекция основных карбапенемаз — blaKCP, blaNDM, blaVIM, blaOXA-48 и blaIMP — у представителей семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, ведущих возбудителей гнойно-воспалительных осложнений. Кроме того, система позволяет проводить генетический анализ грамположительных микроорганизмов и *Clostridium difficile* — возбудителя псевдомембранозного колита, а также выделять гены резистентности у золотистого стафилококка и энтерококков к оксациллину и ванкомицину, соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, автоматизация микробиологической лаборатории позволяет оптимизировать труд и освободить высококвалифицированный персонал от рутинной работы; уменьшить время работы с тестами и сократить

сроки получения результатов. Кроме того, она позволяет снизить влияние человеческого фактора, тем самым минимизировать количество ошибок при выполнении лабораторных исследований.

Автоматизация позволяет повысить безопасность работы медперсонала, так как контакт с потенциально опасным биологическим материалом становится минимальным. Давая возможность оценивать и контролировать состояние лабораторного процесса в том числе в режиме он-лайн, автоматизация позволяет ускорить выдачу антибиотикограммы, что особенно важно для онкологических больных, а также уменьшить количество персонала и обеспечить финансовую выгоду для клиники. А являющаяся результатом качественной и своевременной диагностики рациональная антибиотикотерапия, позволяет не только вылечить больного в конкретном случае, но и уменьшить резистентность микроорганизмов вследствие устранения полипрагмазии, а в конечном итоге снизить летальность и улучшить качество жизни онкологических больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петухова И. Н., Дмитриева Н. В., Багирова Н. С., Григорьевская З. В., Шильникова И. И., Варлан Г. В. и др. Послеоперационные инфекции у онкологических больных, 2016; 4 (21), специальный выпуск 1: 48–53.
2. Давыдов, М. И. Инфекции в онкологии / М. И. Давыдов, Н. В. Дмитриева. — М.: Практическая медицина, 2009. — 472 с.
3. Дмитриева Н. В., Эйдельштейн М. В., Агинова В. В., Петухова И. Н., Григорьевская З. В., Багирова Н. С. и др., Нозокомиальные инфекции, вызванные *Pseudomonas aeruginosa*, в онкологической клинике. Сибирский онкологический журнал. — 2019; 18 (2): 28–34. <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2019-18-2-28-34>
4. Дмитриева, Н. В. Инфекционные осложнения в Онкологической клинике / Н. В. Дмитриева, И. Н. Петухова, А. З. Смоленская // Практическая Онкология. — 2001. — № 1 (5). — С. 18–20.
5. СТРАТЕГИЯ предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года. Утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации от 25 сентября 2017 г. № 2045-р
6. Козлов, Р. С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль / Козлов Р. С. // КМАХ — 2000. — Том 2. — № 1-С. 16–30
7. Дмитриева Н. В., Петухова И. Н., Григорьевская З. В., Багирова Н. С., Терещенко И. В., Григорьевский Е. Д. Полимиксин в клинической практике онколога. Сибирский онкологический журнал. 2018; 17 (3): 88–93. — doi: 10.21294/1814-4861-2018-17-3-88-93.
8. Демиховская, Е. В. Неферментирующие бактерии в аспекте множественной антибиотикорезистентности возбудителей внутрибольничных инфекций / Демиховская Е. В. // Болезнь и антибиотик. — 2012. — № 1 (6) — С. 88–95.
9. Гончаров, Е. А. Эпидемиологические особенности гнойно-септических инфекций, вызванных *Acinetobacter baumannii* в ожоговом и реанимационном отделении: автореф. дис...

- канд. мед. наук: 14.00.30/Е.А. Гончаров.— Санкт-Петербург, 2005.— С. 151.
10. Горбич, Ю.Л. Инфекции, вызванные *Acinetobacter baumannii*: факторы риска, диагностика, лечение, подходы к профилактике/Горбич Ю.Л., Карпов И.А., Кречикова О.И.// Медицинские новости — 2011-№ 5 — С. 31–39.
 11. Землянко О.М., Рогоза Т.М., Журавлева Г.А. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам // Экологическая генетика.— 2018.— Т. 16.— № 3.— С. 4–17. doi: 10.17816/ecogen1634–17.
 12. Ледебур Н.А., Даллас С.Д. Автоматизированная лаборатория клинической микробиологии: факт или фантазия? J Clin Microbiol. 2014; 52 (9): 3140–3146. DOI: 10.1128/JCM.00686–14
 13. Митрохин, С.Д. Концепция профилактики инфекций области хирургического вмешательства у онкологических больных с использованием иммунобиологических препаратов/Митрохин С.Д.//Русский медицинский журнал.—2011.—№ 32—С. 20–32.
 14. Приказ Министерства здравоохранения СССР от 22 апреля 1985 г. N 535 об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений.
 15. Меньшиков В.В. Зачем клинической лаборатории нужна стандартизация и как ее применить на практике?: учебно-методическое пособие. М.: Лабора; 2012.— 71с.
 16. Долгов В.В., Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство.— Т. I.— М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012.— 928 с.
 17. Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р. Масс-спектрометрия — новое слово в клинической микробиологии. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (12): 842–848. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-842-848>
 18. Покровский, В.И. Национальная концепция профилактики инфекций связанных с оказанием медицинской помощи, и информационный материал по ее положениям/В.И. Покровский, В.Г. Акимкин, Н.И. Брико, Е.Б. Брусина, Л.П. Зуева, О.В. Ковалишена и др.-Н. Новгород: Издательство «Ремедиум Поволжье»,— 2012.— 84с.