

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ГЕМОКУЛЬТУР



А.В. Халиулин, А.В. Лямин, О.А. Гусякова, Д.В. Алексеев, В.М. Степанов

Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия

Резюме. Диагностика инфекций кровотока по-прежнему остаются актуальной проблемой современной медицины. Основными возбудителями септических состояний являются грамположительные микроорганизмы, в частности золотистый стафилококк, энтерококки и др., в то время как клиническое значение выделения коагулазонегативных стафилококков неоднозначно. Среди грамотрицательной флоры преобладают *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и другие энтеробактерии, а также *Acinetobacter baumannii*. Современные возможности ускоренной идентификации микроорганизмов из положительных гемокультур, которые основаны на масс-спектрометрии, складываются из двух подходов. Во-первых, предложены разработки фирм-производителей расходных материалов для масс-спектрометрии, во-вторых, имеются «местные» варианты ускоренных протоколов пробоподготовки, используемые микробиологическими лабораториями. Используемые подходы имеют ряд достоинств и недостатков, однако если их резюмировать, то использование предложенных методик в рутинной практике оказывается достаточно ограниченным. При этом потребность в ускорении выдачи микробиологического заключения для данной нозологии велика и ассоциирована с улучшением исходов. В связи с этим целью исследования было оценить сходимость и точность результатов ускоренной идентификации микроорганизмов из положительных гемокультур при инфекциях кровотока. В исследовании было включено 87 положительных гемокультур, идентификация патогенов в них происходила четырьмя способами: классическое микробиологическое исследование крови на стерильность, идентификация патогена напрямую из флакона без выделения чистой культуры, а так же две методики пробоподготовки, основанные на использовании этилендиаминотетрауксусной кислоты (ЭДТУК) и этилендиаминотетраацетата калия двузамещенного (ЭДТА-К2) в качестве отмывочных добавок. Было обнаружено, что грампозитивная и грамотрицательная флора выделялась из крови с примерно одинаковой частотой. При оценке влияния биоматериала используемого для масс-спектрометрии, оказалось, что использование отмывочных добавок увеличивает шансы успешной идентификации бактерий из образца крови. Также было оценено влияние тинкториальных свойств на результаты определения видовой принадлежности изолятов. Идентификация грамположительной флоры оказывается более точной, так как часть патогенов без отмывочных добавок не идентифицировалась, а при использовании ЭДТА-К2 и соответствующей кислоты в этих же образцах удалось идентифицировать патогены до рода. Подобная закономерность была характерна и для грамотрицательной флоры. Вместе с тем современные производители лабораторного оборудования и реагентов позволяют стандартизировать процедуры пробоподготовки в используемых протоколах. Эффекты ЭДТА-К2, позволяющие использовать

Адрес для переписки:

Халиулин Алмаз Вадимович
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89,
Самарский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (846) 337-04-63.
E-mail: a.v.haliulin@samsmu.ru

Contacts:

Almaz V. Khaliulin
443079, Russian Federation, Samara, Chapaevskaya str., 89,
Samara State Medical University.
Phone: +7 (846) 337-04-63.
E-mail: a.v.haliulin@samsmu.ru

Для цитирования:

Халиулин А.В., Лямин А.В., Гусякова О.А., Алексеев Д.В., Степанов В.М.
Оценка возможности повышения качества результатов ускоренной
идентификации микроорганизмов из положительных гемокультур //
Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 369–375. doi: 10.15789/2220-
7619-AAP-2028

Citation:

Khaliulin A.V., Lyamin A.V., Gusyakova O.A., Alekseev D.V., Stepanov V.M.
Assessing a potential to improve data quality for accelerated identification
of microorganisms derived from positive blood cultures // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2,
pp. 369–375. doi: 10.15789/2220-7619-AAP-2028

ее в качестве компонента отмывки, связаны со связыванием ионов кальция и магния в растворе, что снижает адгезию бактериальных клеток к клеткам крови, тем самым способствуя более качественной масс-спектрометрии микробных осадков при ускоренной идентификации микроорганизмов из положительных гемокультур. Таким образом, использование описанных добавок может обеспечивать качественную, своевременную и адекватную диагностику таких серьезных и жизнеугрожающих состояний как инфекции кровотока.

Ключевые слова: пробоподготовка, ускоренная идентификация, инфекции кровотока, бактериемия, биоматериал, центрифугирование.

ASSESSING A POTENTIAL TO IMPROVE DATA QUALITY FOR ACCELERATED IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS DERIVED FROM POSITIVE BLOOD CULTURES

Khaliulin A.V., Lyamin A.V., Gusyakova O.A., Alekseev D.V., Stepanov V.M.

Samara State Medical University of MH RF, Samara, Russian Federation

Abstract. Diagnostics of blood-borne infections is still an urgent problem of modern medicine. The main causative agents of septic conditions are gram-positive microorganisms particularly *Staphylococcus aureus*, enterococci, etc., whereas clinical significance of isolated coagulase-negative staphylococci is ambiguous. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and other enterobacteria, as well as *Acinetobacter baumannii* prevail among the gram-negative flora. Modern possibilities of accelerated identification of microorganisms derived from positive blood cultures based on mass-spectrometry consist of two approaches. Firstly, the manufacturers' developed consumables for mass spectrometry are proposed, and secondly, there are "domestic" developments of accelerated sample preparation protocols developed by microbiological laboratories. The approaches used have a number of advantages and disadvantages, but to summarize, the use of the proposed methods in routine practice is quite limited. At the same time, the need to accelerate the issuing a microbiological conclusion related to nosology is great being associated with improved outcomes. In this regard, the aim of the study was to evaluate convergence and accuracy of results for accelerated identification of microorganisms derived from positive blood cultures in blood-borne infections. The study included 87 positive blood cultures, the identification of pathogens from them occurred in four ways: the classical microbiological analysis of blood for sterility, pathogen identification directly from the vial without isolating a pure culture, as well as two sample preparation methods based on ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and potassium ethylenediaminetetraacetate disubstituted (EDTA-K2) as wash additives. It was found that gram-positive and gram-negative flora were isolated from the blood almost evenly often. When evaluating an influence of biomaterial used for mass spectrometry, it turned out that use of wash additives increases chances of successful identification of bacteria from a blood sample. The influence of tinctorial properties on the results of determining the species assignment of isolates was also evaluated. Identification of gram-positive flora is more accurate, since some pathogens were not identified without washing additives, and when using EDTA-K2 and the corresponding acid, assignment to the genus was obtained in the same samples. A similar pattern was also characteristic of gram-negative flora. At the same time, modern manufacturers of laboratory equipment and reagents allow to standardize sample preparation procedures in the protocols used. The effects of EDTA-K2, which allowing to use it as a washing component, are associated with the binding of calcium and magnesium ions in solution, which reduces the adhesion of bacterial cells to blood cells, thereby contributing to better mass spectrometry of microbial sediments with accelerated identification of microorganisms from positive blood cultures. Thus, use of the described additives can provide high quality, timely and adequate diagnostics of serious and life-threatening conditions such as blood-borne infections.

Key words: sample preparation, rapid identification, bloodstream infections, bacteremia, biomaterial, centrifugation.

Введение

Инфекции кровотока по-прежнему характеризуются высокой смертностью в структуре инфекционной патологии [2]. Среди грам-отрицательных возбудителей септических состояний наиболее часто выделяются *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, а среди грамположительной флоры наиболее часто идентифицируются *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*, у детей особую этиологическую роль играет

Streptococcus agalactiae. Отдельно следует отметить, что диагностическая значимость выделения коагулазонегативных стафилококков дискутабельна, и наиболее часто выделение представителей данной группы микроорганизмов указывает на возможную контаминацию пробы кожной микрофлорой [1]. По данным литературы, грибы редко вызывают инфекции кровотока и, в подавляющем большинстве, фунгемиа обусловлена представителями рода *Candida*.

Имеющиеся на данный момент подходы к идентификации микроорганизмов из поло-

жительных гемокультур складываются из двух основных направлений: микробиологические лаборатории могут использовать коммерческие наборы, разработанные с учетом процедур валидации и верификации, а также множество разнообразных «домашних» протоколов пробоподготовки, разработанных специалистами «на местах» для последующей идентификации патогенов. К первой группе методов могут быть отнесены наборы Sepsityperkit® и RapidSepsityper® (Bruker Daltonics, Германия), набор для посева крови Vitek MS® (bioMérieux, Франция), набор RapidBACpro® II (NittoboMedicalCo., Япония) [5, 10]. Внутренние протоколы лабораторий характеризуются разнообразием используемых технологий, которые могут включать: применение разных режимов центрифугирования, использование пробирок с разделительным гелем, а также различных добавок для лизиса компонентов крови и клеточного детрита, например сапонин, додецилсульфат, тритон X-100, хлорид аммония, трифторуксусная кислота [6, 15]. Обобщая описанные работы, можно заключить, что если протокол прост и не трудоемок, то частота идентификаций остается невысокой — в пределах 50–70%, в то время как более эффективные методики (80–90% успешных случаев идентификации) требуют больше времени и специальных реагентов, что ограничивает их использование в рутинной микробиологической практике.

Улучшение выживаемости при развитии инфекций кровотока обусловлено ранним назначением этиотропной антибактериальной или противогрибковой терапии [8]. В связи с этим актуальными остаются разработки простых и удобных методов ускоренной идентификации патогенов, в том числе с определением чувствительности к антибактериальным препаратам.

Цель исследования — оценка сходимости и точности результатов разных протоколов пробоподготовки при ускоренной идентификации микроорганизмов, выделенных из положительных гемокультур при инфекциях кровотока, при использовании разных отмывочных растворов.

Материалы и методы

В исследование включено 87 положительных гемокультур, полученных при использовании автоматического микробиологического анализатора Юнона LABSTAR 100® (SCENKER, Китай). Идентификация патогенов проводилась 4 способами: I способ — выделение чистой культуры микроорганизма на коммерческих универсальных питательных средах (классическое микробиологическое исследование крови на стерильность); II способ — идентификация

из положительной гемокультуры без выделения чистой культуры из микробного осадка [4]; III способ — 4 мл крови из положительной гемокультуры помещали в пробирку с разделительным гелем, туда же добавляли 1 мл 5% этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТУК); IV способ — 4 мл крови из положительной гемокультуры помещали в пробирку с разделительным гелем и этилендиаминтетраацетатом калия двузамещенным (ЭДТА-К2). Далее проводились идентичные действия с пробирками ЭДТУК и ЭДТА-К2. Центрифугировали при 1000g в течение 12 мин, сливали надосадок. Отмывали осадок 1,5–2,0 мл 0,9% хлорида натрия, отбирали 1,0 мл суспензии, далее центрифугировали при 100g 3 мин, отбирали строго 700 мкл надосадка и центрифугировали его при 10 000g 2 мин, удаляли надосадок, далее добавляли по 25–40 мкл ацетонитрила и 70% муравьиной кислоты (в зависимости от величины осадка), ресуспензировали, центрифугировали при 10 000g 2 мин, удаляли надосадок и на мишень для масс-спектрометрии стерильной петлей наносили материал с осадка, высушивали на воздухе, покрывали матрицей (α -циано-4-гидроксикоричная кислота). Масс-спектрометрию проводили на приборе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия) в режиме Sepsityper, согласно инструкции производителя. Видовая идентификация достигалась при score более 1,800, родовая идентификация при значении 1,600–1,7999, а при значении показателя 0–1,599 идентификация считалась неудачной. В качестве отрицательного контроля использовали раствор матрицы, положительного контроля — штамм кишечной палочки Американской коллекции типовых культур *Escherichia coli* (ATCC 25922). Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «ЮУГМУ Минздрава России» (протокол № 9 от 04.12.2021).

Группировку данных и вычисления проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel® 2013. Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 2.8.7 (разработчик — ООО «Статтех», Россия). Категориальные данные описывались с указанием процентных долей. Сравнение процентных долей при анализе четырехпольных таблиц сопряженности выполнялось с помощью критерия хи-квадрат Пирсона (при значениях ожидаемого явления более 10).

Результаты и обсуждение

При идентификации микроорганизмов классической методикой было выявлено следующее распределение патогенов: отмечается незначительное преобладание частоты выделения

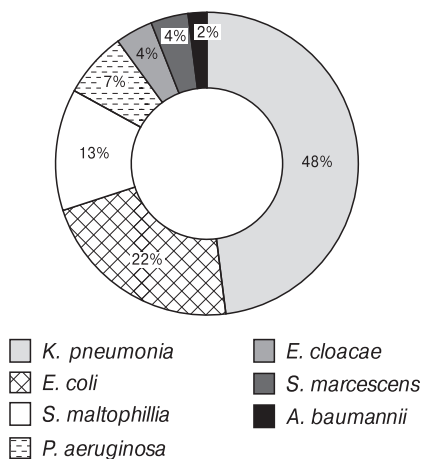


Рисунок 1. Видовое разнообразие грамотрицательной флоры, выделенной из крови пациентов
 Figure 1. Species diversity of gram-negative flora isolated from patient blood

граммотрицательной флоры из образцов (53%), 47% заняли представители грамположительной флоры. Среди грамположительных микроорганизмов в подавляющем большинстве случаев выделялся *Staphylococcus epidermidis*, реже выявлялись *S. aureus* и *Staphylococcus haemolyticus*. Редкими изолятами были *E. faecalis*, а также представители рода *Corynebacterium*.

Грамотрицательные микроорганизмы в нашем исследовании характеризовались большим видовым разнообразием (рис. 1).

На первом этапе нами был выполнен анализ частоты успешной идентификации в зависимости от биоматериала (рис. 2).

Исходя из полученных данных при оценке идентификации в зависимости от биоматериала, нами были установлены статистически значимые различия ($p = 0,002$). Таким образом, использование ЭДТА-К2 способствует увеличению частоты идентификации микроорганизмов из положительной гемокультуры.

С целью уточнения того, результат идентификации каких микроорганизмов улучшился, мы провели анализ зависимости точности идентификации от исследуемого материала и тинкториальных свойств микроорганизмов (табл.).

Согласно полученным данным, при сопоставлении точности идентификации и тинкториальных свойств в зависимости от материала были установлены существенные различия ($p = 0,015$). Выявлено, что при использовании осадка микробов в качестве материала для масс-спектрометрии приемлемый результат идентификации не был получен в 16,1% случаев, в то время как использование отмывочных растворов позволяет более точно определить принадлежность патогена к определенным таксономическим группам: в группе грамположительных микроорганизмов не были идентифицированы 6,9% образцов, в то время как при использовании отмывочных растворов доля неудавшихся идентификаций уменьшилась, а доля родовой и видовой идентификации увеличилась. Для грамотрицательной флоры были получены аналогичные результаты. При этом достоверных различий в результатах идентификации при сравнении групп ЭДТУК и ЭДТА-К обнаружено не было.

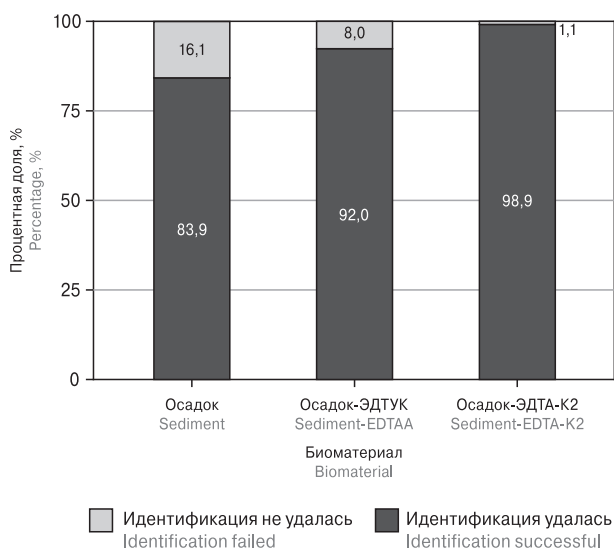


Рисунок 2. Анализ частоты успешной идентификации в зависимости от биоматериала для масс-спектрометрии
 Figure 2. Analysis of frequency of successful identification depending on biomaterial used for mass spectrometry

Обсуждение

В представленной выборке распределение микрофлоры по тинкториальным свойствам при окраске по методу Грама оказалось следующим: примерно поровну для каждой из групп микроорганизмов.

Результаты оценки факторов преаналитического этапа (в частности выбор протоколов пробоподготовки) показали их приоритетное влияние на качество результата идентификации микроорганизмов. В научной литературе имеются данные о сложностях, связанных с масс-спектрометрией грамположительных микроорганизмов, что может быть связано с отличным от грамотрицательной флоры строением бактериальной стенки. В частности, большинство протоколов ускоренной идентификации микроорганизмов из положительных гемокультур основаны на экстракции микросомальных белков

Таблица. Анализ точности идентификации в зависимости от биоматериала и тинкториальных свойств
 Table. Analysis of the accuracy of determination depending on the biomaterial and tinctorial properties

	Точность идентификации Accuracy of identification	Биоматериал Biomaterial			p
		Осадок, % Pellet, %	Осадок-ЭДТУК, % Pellet-EDTA, %	Осадок-ЭДТА-К2, % Pellet-EDTA-K2, %	
Грамположительные микроорганизмы, n = 47 Gram-positive microorganisms, n = 47	Видовая Species	37,9	33,3	39,1	0,015* $P_{\text{Осадок} - \text{Осадок-ЭДТА-К2}} = 0,012$
	Родовая Genus	1,1	10,3	5,7	
	Идентификация не прошла Failed	6,9	2,3	1,1	
Грамотрицательные микроорганизмы, n = 40 Gram-negative microorganisms, n = 40	Видовая Species	41,4	40,2	43,7	
	Родовая Genus	3,4	8,0	10,3	
	Идентификация не прошла Failed	9,2	5,7	0,0	

Примечание. * — различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$).

Note. * — significant differences ($p < 0.05$).

из бактериальных клеток, что может обуславливать ограничения в идентификации грамположительных микробов в силу мощного слоя пептидогликанов, препятствующего выходу белков из цитоплазмы бактерии. Наш протокол предполагает сравнение двух отмывочных добавок: 5% раствор ЭДТУК и ЭДТА-К2. Оказалось, что использование отмывки увеличивает долю идентификации грамположительных патогенов, что связано с конкуренцией ЭДТУК и ЭДТА-К2 за ионы кальция и магния, которые требуются микробным клеткам для адгезии между собой и клетками крови, прежде всего эритроцитами [11]. Подобный эффект описан для моно-, ди- и тринатриевой соли ЭДТУК, однако, как видно из нашей работы, он характерен и для дикалиевой соли ЭДТА. Согласно литературным данным, описано действие солей и собственно ЭДТУК на грамположительную, грамотрицательную микрофлору, грибы и амёбы [7]. Грамотрицательная флора требует присутствия двухвалентных катионов, таких как Mg^{2+} и Ca^{2+} , для стабилизации отрицательно заряженных участков олигосахаридных цепей липополисахаридной стенки. При этом ЭДТА способна удалять катионы из внешнего листка липополисахаридов, обнажая фосфолипиды цитоплазматической мембраны, что увеличивает ее нестабильность [7]. В случае грамположительной флоры механизм действия ЭДТА основан на следующем: в физиологических условиях у микроорганизмов присутствует семейство цистеиновых транспептидаз — сортаз, ответственных за перенос пептидных остовов

на поверхность мембраны, для построения пилей, которые обеспечивают адгезию бактериальной клетки к клеткам организма-хозяина. Кроме этого, сортазы способны сортировать пептиды по бактериальной стенке и «пришивать» их к ней. При этом отмечено, что данные молекулярные структуры не являются жизненно необходимыми для роста и размножения бактериальных клеток, однако они формируют значительный вирулентный потенциал данной группы микроорганизмов [3]. Важно отметить, что грампозитивные микроорганизмы различаются количеством сортаз, количеством пилиновых остовов, необходимых для построения пилей, классом сортаз, а также типами пептидов, транспортируемых к клеточной стенке и акцепторными участками на поверхности бактериальной стенки [13]. Описано, что аллостерическим активатором сортазы типа А, характерной для золотистого стафилококка, являются ионы Ca^{2+} , которые способствуют увеличению активности синтеза пилей и облегчают распознавание сортазами специфических субстратов. Таким образом, логичным представляется эффект ЭДТА в описанном протоколе пробоподготовки, который нивелирует активирующее действие катионов и уменьшает адгезию грамположительной флоры к клеткам крови, что в итоге способствует увеличению микробной массы в конечном материале для масс-спектрометрии, а это, в свою очередь, повышает долю «успешных» идентификаций патогенных микроорганизмов [9]. Различные соли ЭДТА используются в клинической практике с целью уменьшения

образования биопленок в стоматологии, хирургии, а также как потенцирующее средство с рядом антимикробных химиопрепаратов [12, 14].

Результаты наших исследований показали, что статистически достоверной разницы в частоте успешной идентификации микроорганизмов при использовании собственно этилендиаминтетрауксусной кислоты и ЭДТА-К2 не обнаружено, однако с точки зрения трудоемкости и стандартизации методики предпочтительнее отдается использованию дикалиевой соли

ЭДТА, которая доступна как компонент в виде готовых вакуумных пробирок.

Таким образом, проблемы недостаточно успешной идентификации грампозитивной флоры из положительных гемокультур можно решить при использовании известных, доказанных явлений, но в несколько новом «прочтении». Это может способствовать более качественной, своевременной и адекватной диагностике таких серьезных и жизнеугрожающих состояний как инфекции кровотока.

Список литературы/References

1. Гумилевский Б.Ю., Котив Б.Н., Орлова Е.С., Суборова Т.Н., Иванов Ф.В., Сидельникова О.П., Шуклина А.А. Характеристика спектра и чувствительности к антибиотикам бактерий, выделенных из крови пациентов многопрофильной военно-медицинской организации // Вестник новых медицинских технологий. 2022. Т. 29, № 2. С. 32–37. [Gumilevskij B.Ju., Kotiv B.N., Orlova E.S., Suborova T.N., Ivanov F.V., Sidel'nikova O.P., Shuklina A.A. Characteristics of the spectrum and sensitivity to antibiotics of bacteria isolated from the blood of patients of a multidisciplinary military medical organization. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii = Journal of New Medical Technologies*, vol. 29, no. 2, pp. 32–37. (In Russ.)] doi: 10.24412/1609-2163-2022-2-32-37
2. Козлов И.А., Овезов А.М., Раутбарт С.А., Тюрин И.Н., Александровский А.А., Скрипкин Ю.В. Анализ ранних факторов риска летального исхода абдоминального сепсиса как показаний к началу инвазивного мониторинга центральной гемодинамики: ретроспективное обсервационное исследование // Вестник интенсивной терапии им. А.И. Салтанова. 2022. № 2. С. 70–79. [Kozlov I.A., Ovezov A.M., Rautbart S.A., Tjurin I.N., Aleksandrovskij A.A., Skripkin Ju.V. Analysis of heart attack risk of fatal abdominal sepsis as indicated in the initial phase of invasive hemodynamic monitoring: a retrospective observational study. *Vestnik intensivnoi terapii im. A.I. Saltanova = Annals of Critical Care*, no. 2, pp. 70–79. (In Russ.)] doi: 10.21320/1818-474X-2022-2-70-79
3. Петухова И.Н., Дмитриева Н.В., Григорьевская З.В., Багирова Н.С., Терещенко И.В. Инфекции, связанные с образованием биопленок // Злокачественные опухоли. 2019. Т. 9, № 3s1. С. 26–31. [Petuhova I.N., Dmitrieva N.V., Grigor'evskaja Z.V., Bagirova N.S., Tereshhenko I.V. Infections associated with biofilm formation. *Zlokachestvennyye opukholy = Malignant Tumoursis*, 2019, vol. 9, no. 3s1, pp. 26–31. (In Russ.)] doi: 10.18027/2224-5057-2019-9-3s1-26-31
4. Патент № 2766185 С1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/04 (2006.01), G01N 33/48 (2006.01). Способ пробоподготовки для ускоренной идентификации микроорганизмов из положительных гематологических культур; № 2021121607; заявлено 20.07.2021; опубликовано 09.02.2022 / Халиулин А.В., Лямин А.В., Гусякова О.А., Козлов А.В., Балдина О.А.; Патентообладатель: Халиулин А.В. 8 с. [Patent No. 2766185 C1 Russian Federation, IPC C12Q 1/04 (2006.01), G01N 33/48 (2006.01). Sample preparation method for accelerated identification of microorganisms from positive hematological cultures: No. 2021121607; application: 07.20.2021; date of publication 02.09.2022 / Khaliulin A.V., Lyamin A.V., Gusyakova O.A., Kozlov A.V., Baldina O.A. Proprietor: Khaliulin A.V. 8 p.]
5. Ashizawa K., Murata S., Terada T., Ito D., Bunya M., Watanabe K., Teruuchi Y., Tsuchida S., Satoh M., Nishimura M., Matsushita K., Sugama Y., Nomura F. Applications of copolymer for rapid identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*, 2017, vol. 139, pp. 54–60. doi: 10.1016/j.mimet.2017.04.013
6. Caspar Y., Garnaud C., Raykova M., Bailly S., Bidart M., Maubon D. Superiority of SDS lysis over saponin lysis for direct bacterial identification from positive blood culture bottle by MALDI-ToF MS. *Proteomics Clin. Appl.*, 2017, vol. 11, no. 5–6: 1600131 doi: 10.1002/prca.201600131
7. Finnegan S., Percival S.L. EDTA: an antimicrobial and antibiofilm agent for use in wound care. *Adv. Wound Care*, 2015, vol. 4, no. 7, pp. 415–421. doi: 10.1089/wound.2014.0577
8. Kato H., Yoshimura Y., Suido Y., Shimizu H., Ide K., Sugiyama Y., Matsuno K., Nakajima H. Mortality and risk factor analysis for Candida blood stream infection: a multicenter study. *J. Infect. Chemother.*, 2019, vol. 25, no. 5, pp. 341–345. doi: 10.1016/j.jiac.2019.01.002
9. Naik M.T., Suree N., Pngovan U., Liew C.K., Thieu W., Campbell D.O., Clemens J.J., Jung M.E., Clubb R.T. Staphylococcus aureus sortase A transpeptidase. Calcium promotes sorting signal binding by altering the mobility and structure of an active site loop. *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, no. 3, pp. 1817–1826. doi: 10.1074/jbc.M506123200
10. Ponderand L., Pavese P., Maubon D., Giraudon E., Girard T., Landelle C., Maurin M., Caspar Y. Evaluation of Rapid Sepsityper® protocol and specific MBT-Sepsityper module (Bruker Daltonics) for the rapid diagnosis of bacteremia and fungemia by MALDI-ToF-MS. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2020, vol. 19, no. 1, pp. 60–75. doi: 10.1186/s12941-020-00403-w
11. Schieffer K.M., Tan K.E., Stamper P.D., Somogyi A., Andrea S.B., Wakefield T., Romagnoli M., Chapin K.C., Wolk D.M., Carroll K.C. Multicenter evaluation of the Sepsityper™ extraction kit and MALDI-ToF MS for direct identification of positive blood culture isolates using the BD BACTEC™ FX and VersaTREK® diagnostic blood culture systems. *J. Appl. Microbiol.*, 2014, vol. 116, no. 4, pp. 934–941. doi: 10.1111/jam.12434
12. Sharma M., Visai L., Bragheri F., Cristiani I., Gupta P.K., Speziale P. Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, vol. 52, no. 1, pp. 299–305. doi: 10.1128/AAC.00988-07

13. Spirig T., Weiner E.M., Clubb R.T., Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, 2011, vol. 82, no. 5., pp. 1044–1059. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07887.x
14. Walsh S.E, Maillard J.Y., Russell A.D., Catrenich C.E., Charbonneau D.L., Bartolo R.G. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and-negative bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, vol. 94, no. 2, pp. 240–247. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01825.x
15. Yuan Y., Wang J., Zhang J., Ma B., Gao S., Li Y., Wang S., Wang B., Zhang Q., Jing N. Evaluation of an optimized method to directly identify bacteria from positive blood cultures using MALDI-ToF mass spectrometry. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2020, vol. 34: e23119. doi: 10.1002/jcla.23119

Авторы:

Халиулин А.В., старший преподаватель кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Лямин А.В., д.м.н., доцент, профессор кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Гусякова О.А., д.м.н., доцент, зав. кафедрой фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Алексеев Д.В., студент института клинической медицины ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Степанов В.М., студент института клинической медицины ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Authors:

Khaliulin A.V., Senior Lecturer, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;

Lyamin A.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Professor of the Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;

Gusyakova O.A., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;

Alekseev D.V., Student, Institute of Clinical Medicine, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;

Stepanov V.M., Student, Institute of Clinical Medicine, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation.

Поступила в редакцию 13.09.2022
Отправлена на доработку 11.02.2023
Принята к печати 21.02.2023

Received 13.09.2022
Revision received 11.02.2023
Accepted 21.02.2023