

**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ТЕСТОВ ПРИ
ДИАГНОСТИКЕ БАКТЕРИЕМИИ И СЕПСИСА У ДЕТЕЙ
CLINICAL SIGNIFICANCE OF LABORATORY TESTS IN THE DIAGNOSIS OF
BACTEREMIA AND SEPSIS IN CHILDREN**

Боронина Л.Г.

Boronina L.G.

Боронина Любовь Григорьевна - д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики и бактериологии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки. ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России. 620028, Екатеринбург, ул. Репина, д. 3. Заведующая лабораторией клинической микробиологии. ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1». 620149, Екатеринбург, ул. Серафимы Дерябиной, д. 32. E-mail: boroninalg@mail.ru.

Boronina Lyubov Grigoryevna - MD, PhD, Dr. Med. Sci., Professor of the Clinical Laboratory and Bacteriology Diagnosis Department, Faculty of Postgraduate Education. Ural State Medical University. 3, Repina St., Ekaterinburg, 620028, Russia. Head of the Clinical Microbiology Laboratory. Regional Children Hospital 1. 32, S. Derybinoi St., Ekaterinburg, 620149, Russia. E-mail: boroninalg@mail.ru.

Аннотация.

В статье представлены результаты диагностики бактериемии и сепсиса у 5207 детей с использованием различных лабораторных тестов.

Ключевые слова: сепсис; бактериемия; лабораторные тесты; дети.

Resume.

The article presents the results of the diagnosis of bacteremia and sepsis in 5207 children with a variety of laboratory tests.

Key words: sepsis; bacteremia; laboratory tests; children.

Введение. Сепсис по-прежнему остается одной из самых актуальных проблем медицины в силу высокой летальности, значительных экономических затрат, причиняемого этим заболеванием. По прогнозам, в ближайшие десять лет ожидается резкое увеличение числа больных сепсисом в связи с развитием инвазивных медицинских технологий, длительностью пребывания пациентов в отделениях реанимации, увеличением количества высокотехнологичных медицинских манипуляций, а также увеличением количества микроорганизмов, устойчивых к большинству антибиотиков и антисептиков вследствие неадекватного применения антибиотиков широкого спектра действия. Бактериологическое исследование сепсиса дает возможность верифицировать возбудитель, определить антибиотикограмму и является определяющей в выборе адекватных режимов антибактериальной терапии [1, 2, 3, 4, 6, 7, 8].

Согласно приказу № 535 от 22 апреля 1985 г. [5] посев крови рекомендовано производить на несколько приготовленных питательных сред, чтобы обеспечить возможность роста максимально большому числу вероятных возбудителей, минимум на: «двойную среду» (состоящая из скошенного во флаконе питательного агара и полужидкой среды, приготовленной на питательном бульоне) и «среду для контроля стерильности». Современные специальные готовые коммерческие флаконы [9], позволяют обнаружить рост большинства микроорганизмов в течение 6-8 часов инкубации (до 24 часов), что позволяет уже через 24-48 часов получить результаты точной идентификации возбудителя и его антибиотикограмму.

Для экспресс-диагностики сепсиса используется определение концентрации прокальцитонина (PCT) в сыворотке. Повышение концентрации PCT 2 нг/мл и выше происходит только при системном ответе организма на бактериальную инфекцию. Контроль эффективности проводимой антимикробной терапии также можно оценить при повторном исследовании сыворотки крови пациента на количественное определение PCT (период полураспада PCT составляет около 24 часов) [2, 10, 11].

Цель исследования – изучение клинического значения лабораторных тестов при диагностике бактериемии и сепсиса у детей.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ бактериологических исследований крови у больных, находившихся на лечении в разных отделениях ГБУЗ СО «ОДКБ № 1» с января 2012 года по сентябрь 2015 года. Всего за исследуемый период проведено 7012 исследования проб крови от 5207 пациентов: в 2012 г. - 1813 от 1369, в 2013 г. – 1991 от 1422, в 2014 г. - 1952 от 1394, за 8 месяцев 2015 г. - 1256 от 1022. При этом практически в половине случаев (от 43 до 52,2%) пробы из отделений

анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии новорожденных и недоношенных детей от больных с диагнозами: недоношенность, врожденный порок сердца, ВУИ, синдром аспирации меконием, гипоксическое поражение ЦНС, респираторный дистресс-синдром, внутриутробный сепсис.

Для посева крови использовались: системы для гемокультур «Signal» («Oxoid», Великобритания), двухфазная среда («bioMerieux», Франция), флаконы для автоматического анализатора гемокультур «BACTEC 9050» («Becton Dickinson», США).

Отбор крови на бактериологическое исследование производили согласно общепринятым методам [9].

Идентификацию выделенных микроорганизмов и антибиотикочувствительность проводили как классическим бактериологическим методом, так и на полуавтоматическом АТВ Expression (bioMerieux) и Sensititre (TREC Diagnostic Systems) и автоматическом MicroScan WalkAway 96 (Siemens) анализаторах.

В 2012 - 2014 гг. от 362 больных с подозрением на сепсис проведено количественное исследование определения прокальцитонина (PCT) в 734 пробах сыворотки крови методом фермент-связанного флюоресцентного анализа на автоматическом анализатором MiniVidas («bioMerieux», Франция).

Результаты исследования и их обсуждение. Весь спектр выделенных микроорганизмов из крови представлен на рисунке 1, а их распределение по годам в таблице 1.

Коагулазоотрицательные стафилококки, представители семейства энтеробактерий по-прежнему лидируют среди возбудителей бактериемии и сепсиса.

Staphylococcus epidermidis, *Staphylococcus haemolyticus* и *Staphylococcus hominis* с одной стороны, могут являться контаминантами при нарушении качества сбора материала. С другой стороны они могут иметь этиологическое значение, особенно у недоношенных детей, и при катетер-ассоциированных инфекциях, что требует проведение неоднократных посевов крови (не менее трех) и количественной оценки уровня прокальцитонина.

Выявлена тенденция к росту роли *S. aureus* - за три года увеличивается выделение его из крови: с 6 штаммов в 2012 году до 11 за 8 месяцев 2015 года.

Среди энтеробактерий частота выделения *E. coli* за последние два года сохраняется примерно на одном и том же уровне, а выделение *K. pneumoniae* уменьшилось более чем в два раза: с 14 штаммов в 2012 году до 1 за 8 месяцев 2015 года).

В 2012-2014 гг. у пациентов с гнойно-септическими заболеваниями (преимущественно от пациентов реанимационных отделений) производилось параллельное исследование посева крови и количественное определение маркера сепсиса – прокальцитонина. При параллельном исследовании крови на стерильность и количественного содержания РСТ в сыворотке, при значениях, указывающих на высокий риск возникновения сепсиса, в гемокультурах чаще обнаруживали энтеробактерии (*K. pneumoniae*).

Количественное определение РСТ в 2012 г. проведено у 164 детей (316 проб), из них от 84 пациентов (51,3%), исследования проводились повторно. Трех- и более кратные исследования в динамике были произведены от 38 пациентов (23,2%).

В 2013 г. исследование проведено у 137 детей (309 проб), из них от 52 пациентов (37,9%), исследования проводились повторно. Трех- и более кратные исследования в динамике были произведены от 38 пациентов (17,5%).

Повторные исследования РСТ проводили с целью определения эффективности проводимой антимикробной терапии, которое подтверждалась значительным снижением количества РСТ (в 2 и более раз).

Примеры результатов параллельного исследования сыворотки на РСТ и посева крови представлены в таблице 2.

Концентрация РСТ < 0,5 нг/мл соответствует низкой степени риска развития тяжелого сепсиса и/или септического шока. Концентрация РСТ > 2 нг/мл соответствует высокой степени риска развития тяжелого сепсиса и/или септического шока [2, 10, 11].

С учетом результатов параллельного проведения РСТ все выделенные штаммы *K. pneumoniae*, № 1 и № 4 *P. aeruginosa*, № 4 *S. epidermidis*, № 2 *S. haemolyticus* и штамм *E. faecalis* явились возбудителями сепсиса (табл. 2). В тех случаях, когда обнаружен микроорганизм и значения РСТ между 0,5 и 2,0 нг/мл результат необходимо интерпретировать, принимая во внимание анамнез и клиническую картину каждого конкретного больного. При выделении из крови штаммов № 1 *S. epidermidis* и *S. haemolyticus*, а также *S. aureus* уровень РСТ < 0,5 нг/мл, что не исключает возможности наличия локальной инфекции или системной инфекции на начальной стадии (< 6 часов) [10, 11]. В случаях когда микроорганизмы не выделены, а уровень прокальцитонина высок, вероятно, связано со сбором крови на фоне применения антибиотиков, к которым возбудитель чувствителен, что подтверждалась значительным снижением количества РСТ (в 2 и более раз) при повторных исследованиях.

По результатам исследования все примененные нами коммерческие питательные среды позволяют обнаружить рост аэробных, анаэробных, и микроаэрофильных

микроорганизмов, в том числе грибов и таких прихотливых микроорганизмов как: *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. Как правило, рост микроорганизмов в них наблюдается уже впервые 6-8 часов после посева, что в свою очередь дает возможность получить результат точной идентификации возбудителя и его антибиотикограмму уже через 24-48 часов. В зависимости от возможностей лаборатории оптимально иметь в работе все использованные нами для посева крови среды. С одной стороны при большом количестве проб крови удобнее применять автоматический анализатор гемокультур, так как бактериолог не тратит время на их просмотр, и устраняются возможные ошибки визуального учета – анализатор тестирует химический сенсор, чувствительный к уровню CO₂, продуцируемому микроорганизмами в процессе роста, флакона каждые 10 минут и не зависит от освещения и более надежен, чем человеческий глаз. С другой стороны в автоматический анализатор не рекомендуется ставить флаконы с кровью, которые уже хранили в термостате и принесли в лабораторию на следующий день, так как в них при росте микроорганизмов может уже накопиться определенный уровень CO₂, который прибор при постановке в него считает за начальный, а в процессе последующей инкубации этот уровень CO₂ не увеличится. Кроме того возможны ситуации связанные с поломками прибора или отключением питания. Двухфазная среда удобна тем, что имеет кроме бульона, плотную питательную среду, где виден характер роста колоний микроорганизма, эту культуру можно сразу использовать для идентификации и постановки антибиотикочувствительности, в том числе на тест-системах для автоматических анализаторов. Также можно учитывать газообразование по разрывам данной среды, что в некоторых случаях очень важно для идентификации бактерий. Системы для гемокультур «Signal» - это флакон с 84 мл питательного бульона с факторами роста. Они имеют специальные прозрачные индикаторы роста, которые помещают сверху на флакон, куда уже произведен посев крови с соблюдением всех правил стерильности, после инкубации его при 36 ± 1 °С в течение 1 часа. Общая длительность инкубации флакона с посевом и присоединенным индикатором роста 7 дней, просмотр системы производится два раза в день. Положительная культура крови, демонстрирующая рост микроорганизмов, определяется внешним видом кровяно-бульонной смеси в прозрачном индикаторе роста выше запорного приспособления. Преимущественно рост микроорганизмов обнаруживался на первые сутки, в среднем впервые 6-8 часов. Данное приспособление очень удобно, так как понять есть или нет рост в других жидких питательных средах для посева крови при просмотре только самого флакона бывает очень сложно, особенно при посеве крови от онкологических больных. Посевы крови, от которых более мутные, и могут имитировать рост

микроорганизмов, в результате чего приходится лишний раз осуществлять микроскопию.

Представляем клинические примеры выделения гемокультуры с использованием описываемых лабораторных тестов.

Клинический пример 1. Ребенок К. (мальчик) родился в результате преждевременных родов в сроке 32 нед., при рождении поставлен диагноз «Недоношенность II ст.», переведен в отделение анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии новорожденных и недоношенных детей. Из крови, забранной в первые сутки после рождения до назначения антибиотиков, выделен *S. agalactiae*. Штамм чувствителен к ампициллину, левофлоксацину, линезолиду, офлоксацину, пенициллину. Достоверных случаев устойчивости к β -лактамым антибиотикам в литературе не описано. РСТ = 2 нг/мл. По результатам антибиотиграммы ребенку проведена антибиотикотерапия ампициллином. Очевидно, имело место внутриутробное инфицирование плода, обусловившее в постнатальном периоде развитие септического состояния, что подтверждается данными из обменной карты беременной – у женщины в сроке 30 нед. из цервикального канала выделен *S. agalactiae*.

Клинический пример 2. Ребенок Л. (мальчик) родился в результате преждевременных быстрых родов в сроке 31-32 нед., переведен в отделение анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии новорожденных и недоношенных детей. Состояние с рождения стабильно тяжелое. Из крови, забранной в первые сутки после рождения до назначения антибиотиков, выделена *L. monocytogenes*, чувствительная к ампициллину и пенициллину. РСТ = 10 нг/мл. После проведения антибиотикотерапии с учетом результатов антибиотикограммы, ребенок выписан домой с улучшением. Выставлен окончательный диагноз «респираторный дистресс-синдром, дыхательная недостаточность I ст. Недоношенность II ст. Внутриутробный сепсис (листериоз)». Следовательно, тяжесть состояния новорожденного обусловлена внутриутробной инфекцией, и листериоз у матери диагностирован ретроспективно, на основании результатов обследования ребенка. Из отделяемого цервикального канала родильницы, собранного на вторые сутки после родов, выделена в единичном росте *L. monocytogenes*, чувствительная к ампициллину и пенициллину.

Таким образом, для диагностики сепсиса необходимо проведение бактериологического исследования крови с неоднократным (не менее трех раз) посевом крови на качественные питательные среды содержащие все необходимые факторы роста. С обязательным определением чувствительности выделенных штаммов

микроорганизмов к антимикробным препаратам. Для экспресс-диагностики сепсиса целесообразно проводить исследование крови на определение уровня РСТ. Оба исследования необходимо проводить одновременно, а для дальнейшей оценки адекватной антибиотикотерапии необходимо повторное определение уровня РСТ через несколько часов от начала терапии.

ЛИТЕРАТУРА

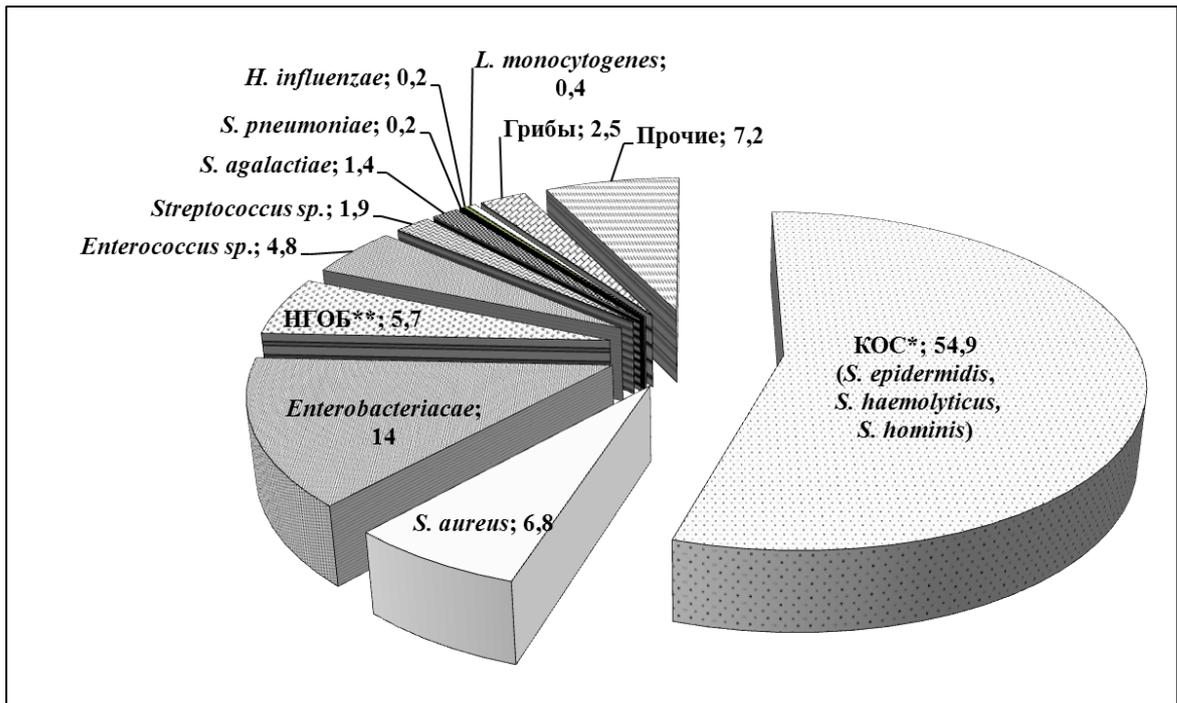
1. Багирова Н.С. Диагностика бактериемии: что нового? Материалы конференции Национальные дни лабораторной медицины России, Москва, 1-3 октября 2014. – URL: <http://www.mma-expo.ru/lab/2014/visitors/presentations/2-3-14> - Н.С. Багирова. Диагностика бактериемии.pdf.
2. Бокерия Л.А., Белобородова Н.В. Инфекция в кардиохирургии. – М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2007. – 582 с.
3. Грувер К.П., Белобородов В.Б. Клиническое значение бактериемии у больных сепсисом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т. 13, № 1. – С. 90-97.
4. Методики клинических лабораторных исследований: справочное пособие. Т. 3. Клиническая микробиология / под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Лабора, 2009. – 880 с.
5. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях ЛПУ: приказ № 535 от 22 апреля 1985 г. – Москва, 1985. – 126 с.
6. Руководство по медицинской микробиологии. Книга III. Том второй. Оппортунистические инфекции: клинико-эпидемиологические аспекты / под ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Волиной, Е.П. Ковалевой. – М.: Издательство БИНОМ. 2014. – 880 с.
7. Сепсис в начале XXI века. Классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение. Патолого-анатомическая диагностика: практическое руководство / под ред. В.С. Савельева, Б.Р. Гельфанда. – М.: Литтерра, 2006. – 176 с.
8. Спектр возбудителей бактериемии у пациентов с иммунодефицитными состояниями различного происхождения / О.В. Полухина, Т.Н. Суборова, А.А. Кузин, А.Н. Петров, В.В. Осовских, Д.А. Гранов и др. // Инфекция и иммунитет. – 2014. – Т. 14, № 1. – С. 43-48.
9. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории: Метод. указания 4.2.2039-05 // Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. – М., 2005. – 116 с.
10. Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in medical intensive care unit / В. Muller, K.L. Becker, Schachinger H., Rickenbacher P.R., P.R. Huber, W. Zimmerli et al. // Crit. Care Med. – 2000. – Vol. 28, N 4. – P. 977-983.
11. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6 and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis / S. Harbarth, K. Holeckova, C. Froidevaux, D. Pittet, B. Ricou, G.E. Grau et al. // Am J. Resp. Crit. Care Med. – 2001. – Vol. 164. – P. 396-402.

Таблица 1. Культуры микроорганизмов выделенных из крови

Микроорганизм	Количество культур							
	2012 г.		2013 г.		2014 г.		За 8 месяцев 2015 г.	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Коагулазоотрицательные стафилококки	50	50,5	92	52,9	85	63	39	51,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	6,1	7	4,2	9	6,6	11	14,4
Enterobacteriaceae:	21	21,2	25	14,4	13	9,6	9	11,9
<i>Escherichia coli</i>	5	5	11	6,3	7	5,1	7	9,3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2	1	0,6	-	-	1	1,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	14,2	13	7,5	6	4,5	1	1,3
Неферментирующие грамотрицательные бактерии:	3	3	13	7,5	7	5,2	4	5,4
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	1	0,6	5	3,7	2	2,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	3	7	4	2	1,5	2	2,6
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	-	5	2,9	-	-	-	-
Энтерококки:	3	3	12	6,8	6	4,5	2	2,6
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	2	6	3,4	5	3,7	1	1,3
<i>Enterococcus sp.</i>	1	1	6	3,4	1	0,8	1	1,3
<i>Streptococcus sp.</i>	5	5,1	2	1,1	1	0,8	1	1,3
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1	4	2,2	1	0,8	1	1,3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-	-	-	-	1	1,3
<i>Listeria monocytogenes</i>	2	2	-	-	-	-	-	-
Грибы:	1	1	3	1,7	8	5,9	-	-
<i>Candida albicans</i>	1	1	-	-	2	1,5	-	-
<i>Non-C. albicans</i>	-	-	3	1,7	6	4,5	-	-
Прочие микроорганизмы	6	6,1	16	9,2	5	3,7	8	10,5
Всего	99	100	174	100	135	100	76	100

Таблица 2. Результаты параллельного исследования сыворотки на РСТ и посева крови (от разных пациентов)

Микроорганизмы, выделенные из крови	№ штамма	Результат РСТ, нг/мл
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	37,62
	2	17,27
	3	6,49
	4	23,83
	5	16,91
<i>Escherichia coli</i>	1	0,77
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1,22
	2	0,57
	3	0,51
	4	5,93
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0,41
	2	0,93
	3	0,51
	4	2,77
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	<0,05
	2	6,92
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0,36
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1,45
Микроорганизм не выделен	1	4,32
	2	135,08



Подпись к рисунку:

Рис. 1. Микроорганизмы выделенные из крови, в %, n=484

* КОС – коагулазоотрицательные стафилококки (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*),

** НГОБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*)

Подпись автора:

Боронина Л.Г.