

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УНИВЕРСАЛЬНОЙ КОМПЬЮТЕРНОЙ ПРОГРАММЫ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ СТАФИЛОКОККОВ ДЛЯ СРАВНЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕСТ-СИСТЕМ «STAPHYTEST-8» И «STAPHYTEST-16» (LACHEMA, ЧЕХИЯ)

Предложено использование универсальной компьютерной программы идентификации стафилококков в качестве инструмента для исследования диагностической эффективности коммерческих идентификационных тест-систем на примере «STAPHYtest-8» и «STAPHYtest-16» (Lachema, Чехия). Установлены низкая эффективность панели «STAPHYtest-8», относительный рост идентификационных возможностей «STAPHYtest-16», а также причины возникающих диагностических ошибок. На основе анализа информативности отдельных используемых идентификационных тестов определены возможные пути дальнейшего совершенствования этих и подобных диагностических тест-систем.

В предыдущей работе [1] нами рассмотрена возможность применения современных многомерных статистических методов для решения задачи видовой идентификации стафилококков. В частности, была обоснована целесообразность использования для этой цели процедуры кластерного анализа, основанной на вычислении наибольшей близости каждого из вновь анализируемых объектов (штаммов) с каким-либо из видов стафилококков с известными таксономическими характеристиками как неких «точек» в многомерном пространстве, сформированном на основе данных об описанных в международном определителе Берджи [2] 36 видах и подвидах стафилококков, каждый из которых охарактеризован по 36 таксономически значимым биологическим характеристикам.

На данной основе в системе программирования Delphi 5 авторами разработана компьютерная программа, позволяющая автоматизировать и унифицировать процедуру видовой идентификации стафилококков. Основным отличием данной программы от известных аналогов является то, что она жестко не связана ни с одной из известных коммерческих диагностических тест-систем и представляет собой «открытую систему», позволяющую получать требуемый результат при использовании любой комбинации тестов, в том числе самостоятельно выполняемых исследователем. Дополнительные особенности программы заключаются в возможности ее использования для оценки эффективности существующих отечественных и зарубежных диагностических тест-систем на основании сравнения результатов идентификации, полученных с их использованием, а также на основе применения предусмотренных в программе комплекса конвенциональных тестов.

В этой связи в качестве возможного объекта исследования наше внимание привлекла диагностическая тест-система для идентификации стафилококков, выпускаемая фирмой Lachema (Чехия)

под коммерческим названием «STAPHYtest». Данная тест-система достаточно широко представлена на российском рынке лабораторного оборудования и материалов, что объясняется традициями ее использования со времен СССР. Следует отметить, что за этот период произошла определенная эволюция тест-системы от использования 8-ми к использованию 16-ти дифференцирующих тестов, что представляет дополнительный интерес для анализа в плане получения представлений о результативности подобной модификации.

Таким образом, целью настоящей работы явилось использование разработанной авторами универсальной компьютерной программы видовой идентификации стафилококков для сравнительного изучения диагностической эффективности тест-систем «STAPHYtest-8» и «STAPHYtest-16» (Lachema, Чехия) с определением возможных путей дальнейшего совершенствования последней.

При проведении работы была использована группа эталонных штаммов стафилококков с известной видовой принадлежностью и биологическими характеристиками, полученных из музея живых бактериальных культур Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии МЗ РФ им.Н.Ф.Гамалеи (Москва). Кроме того, при оценке эффективности сравниваемых тест-систем в ряде случаев создавался «виртуальный образ штамма», характеризуемый наличием или отсутствием предусмотренных для использования в системах «STAPHYtest» и в универсальной компьютерной программе таксономически значимых характеристик. Всего при выполнении настоящей работы учтены данные о 87 объектах наблюдения. Полученные результаты обработаны с использованием методов вариационной статистики [3]. Для характеристики информативности отдельных биологических характеристик стафилококков, значимых для их межвидовой дифференциации, использована мера Кульбака [4].

Результаты идентификации стафилококков по трехзначному цифровому коду, предусмотренному при использовании тест-системы «STAPHYtest-8», позволили констатировать совпадение с результатами, полученными с использованием универсальной компьютерной программы по совокупности 36 конвенциональных тестов, лишь в $44,83 \pm 5,33$ % случаев. Таким образом видовая принадлежность более половины штаммов стафилококков, исследуемых с использованием данной тест-системы, оказывается установленной неверно, что девальвирует многие научные результаты, ранее полученные с использованием тест-системы «STAPHYtest-8».

Анализ причин неверной идентификации позволил свести их к двум основным моментам. Ошибки первого рода были связаны с тем, что несмотря на заявленные диагностические возможности тест-системы как достаточные для идентификации определенного спектра видов стафилококков, полученный результат все же оказывался неверным ($26,43 \pm 4,72$ % от общего количества диагностических заключений). Ошибки второго рода были связаны с тем, что диагностические возможности данной тест-системы принципиально не позволяли получить верное заключение, так как она изначально предусматривала возможность идентификации только 13 из 36 известных видов стафилококков ($10,34 \pm 3,2$ % от общего количества диагностических заключений). Последняя причина являлась ведущей – на ее долю приходилось более половины всех ошибочных результатов идентификации и $28,74 \pm 4,85$ % от общего количества полученных диагностических заключений.

При анализе эффективности идентификации отдельных видов стафилококков (рисунок) было установлено, что наилучшие результаты были получены для ряда видов с ограниченной клинической значимостью - *S.auricularis*, *S.cohnii*, *S.lugdunensis* и *S.schleiferi* (75-100% правильных результатов идентификации). В интервале 50-74% правильных результатов расположились наиболее клинически значимые виды коагулазоотрицательных стафилококков, идентифицированные с использованием тест-системы «STAPHYtest-8» как *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis* и *S.saprophyticus*. Наиболее же низкая эффективность была продемонстрирована для стафилококков, отнесенных к видам *S.aureus*, *S.capitis*, *S.warneri* и *S.xylosum*, а в отношении микроорганизмов, идентифицированных как *S.simulans*, не было получено ни одного правильного диагностического заключения.

Данные существенные недостатки, а также произошедшие в 80-90-х годах XX века принци-

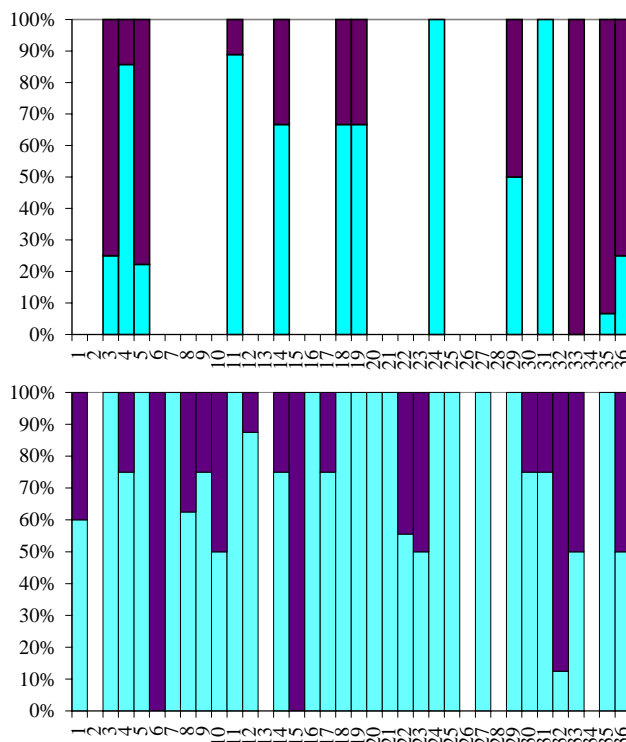


Рисунок. Эффективность идентификации отдельных видов стафилококков с использованием тест-систем «STAPHYtest-8» (верхняя часть рисунка) и «STAPHYtest-16» (нижняя часть рисунка).

По оси ординат – процент идентифицированных штаммов. Обозначения: светлая часть – правильная идентификация; темная часть – неправильная идентификация.

По оси абсцисс – идентифицируемые виды стафилококков:
 1 - *S. arlettae*; 2 - *S. aureus* subsp. *anaerobius*; 3 - *S. aureus* subsp. *aureus*; 4 - *S. auricularis*; 5 - *S. capitis* subsp. *capitis*; 6 - *S. capitis* subsp. *ureolyticus*; 7 - *S. caprae*; 8 - *S. carnosus*; 9 - *S. caseolyticus*; 10 - *S. chromogenes*; 11 - *S. cohnii* subsp. *cohnii*; 12 - *S. delphini*; 13 - *S. epidermidis*; 14 - *S. epidermidis*; 15 - *S. equorum*; 16 - *S. felis*; 17 - *S. gallinarum*; 18 - *S. haemolyticus*; 19 - *S. hominis*; 20 - *S. hyicus*; 21 - *S. intermedius*; 22 - *S. kloosii*; 23 - *S. lentis*; 24 - *S. lugdunensis*; 25 - *S. muscae*; 26 - *S. pasteurii*; 27 - *S. piscifermentans*; 28 - *S. saccharolyticus*; 29 - *S. saprophyticus*; 30 - *S. schleiferi* subsp. *coagulans*; 31 - *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*; 32 - *S. sciuri*; 33 - *S. simulans*; 34 - *S. vitulunus*; 35 - *S. warneri*; 36 - *S. xylosum*

альные изменения в номенклатуре и таксономии стафилококков [5], подтолкнули разработчиков к существенной модификации тест-системы, поначалу выразившейся в рекомендациях по использованию дополнительных идентификационных тестов, а в итоге приведшей к ее полному пересмотру. При этом из тест-системы был удален тест на образование кислоты из глицерина, используемый не столько для межвидовой дифференциации стафилококков, сколько для их разделения с морфологически сходными микроорганизмами – микрококками. Кроме того, из инструкции к набору были выведены рекомендации по определению каталазы, также малоинформативной при межвидовой дифференциации стафилококков и используемой для их различения с каталазоотрицательными грамположитель-

ными кокками – *Stomatococcus*, *Aerococcus* и *Enterococcus*. На замену было предложено дополнительное определение десяти новых биохимических характеристик, что в комбинации с ранее используемыми тестами на уреазу, нитраты, фосфатазу, сахарозу, трегалозу и маннитол позволило сформировать панель «STAPHYtest-16». Кроме того, использование данной системы предполагает дополнительное проведение тестов на ацетоин и оксидазу, что в совокупности позволяет говорить об использовании для целей межвидовой дифференциации стафилококков уже 18 биологических характеристик. Соответственно расширился и заявляемый перечень идентифицируемых видов, согласно инструкции к постановке «STAPHYtest-16» включающий 31 из 36 известных видов и подвидов стафилококков за исключением относительно недавно описанных *S.delphini*, *S.pasteuri*, *S.saccharolyticus* и *S.vituluns*, а также редко встречающегося подвида *S.aureus* subsp. *anaerobius*.

Результаты идентификации стафилококков по совокупности идентификационных тестов, предусмотренных при использовании тест-системы «STAPHYtest-16», позволили констатировать ее достаточно высокую диагностическую эффективность, выразившуюся в совпадении с результатами, полученными с использованием универсальной компьютерной программы по совокупности 36 конвенциональных тестов, в $73,83 \pm 3,6\%$ случаев. Подобная точность соответствует таковой у большинства аналогичных тест-систем для видовой идентификации стафилококков: API Staph – Trac (73%), API 20GP (61%), Vitek GPI (67%) [6]; MicroScan Pos ID (79%), Rapid Pos IP (76%) [7], что позволяет оценить ее как достаточную для выполнения рутинных микробиологических исследований.

Анализ диагностической эффективности данной тест-системы по отношению к 10 наиболее распространенным видам стафилококков, обитающим на коже и слизистых оболочках тела человека, и 10 типичным «зоофитным» видам позволил констатировать, что в первом случае верные идентификационные заключения были получены в $83,54 \pm 11,7\%$, а во втором только в $54,25 \pm 15,7\%$ случаев, что соответственно несколько выше и ниже среднего уровня. Данное распределение является достаточно типичным и мало отличает тест-систему «STAPHYtest-16» от большинства существующих коммерческих идентификационных тест-систем, в первую очередь ориентированных на выявление клинически значимых видов стафилококков, играющих роль в патологии человека.

Выявленные ошибки при использовании тест-системы «STAPHYtest-16» преимущественно были связаны с тем, что несмотря на заявленные диагностические возможности как достаточные для выявления 31 вида и подвида стафилококков, полученный при их идентификации результат оказывался неверным ($16,78 \pm 3,06\%$ от общего количества диагностических заключений, что в то же время более чем на 10% меньше аналогичного показателя при использовании тест-системы «STAPHYtest-8»). На долю второй причины, определяемой изначально невозможностью идентификации оставшихся 5 видов и подвидов стафилококков приходилось только $9,40 \pm 2,39\%$ от общего количества полученных диагностических заключений. При этом именно более чем трехкратное снижение доли подобных ошибочных результатов по сравнению с аналогичным показателем при использовании тест-системы «STAPHYtest-8» явилось основной причиной выявленного роста диагностической эффективности тест-системы «STAPHYtest-16».

При анализе эффективности идентификации отдельных видов стафилококков (рисунок) было установлено, что для представителей 14 видов и подвидов была продемонстрирована 100% диагностическая точность. В данную группу вошли все три коагулазопозитивных вида - *S.aureus*, *S.hyicus*, и *S.intermedius*, а также *S.capitis* subsp. *capitis*, *S.caprae*, *S.cochonii* subsp. *cochonii*, *S.felis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis*, *S.lugdunensis*, *S.muscae*, *S.piscifermentans*, *S.saprophyticus* и *S.warneri*. Не менее чем 75% достоверных результатов было получено в отношении стафилококков, идентифицированных как *S.auricularis*, *S.caseolyticus*, *S.cochonii* subsp. *urealiticum*, *S.epidermidis*, *S.gallinarum* и *S.schleiferi*. В интервале 50-74% правильных результатов преимущественно расположились виды коагулазоотрицательных стафилококков животного происхождения, идентифицированные с использованием тест-системы «STAPHYtest-16» как *S.arlettae*, *S.carnosus*, *S.chromogenes*, *S.kloosii*, *S.lentis*, *S.simulans* и *S.xylosus*. Наиболее же низкая эффективность была продемонстрирована для стафилококков, отнесенных к видам *S.sciuri*, *S.capitis* subsp. *ureolyticus* и *S.equorum*, причем в отношении двух последних не было получено ни одного правильного диагностического заключения.

В целом по результатам сравнительного анализа тест-систем «STAPHYtest-8» и «STAPHYtest-16» в отношении отдельных видов стафилококков можно констатировать значительное повышение точности идентификации *S.aureus*, *S.capitis*,

S. hominis, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* и *S. warneri*. По-прежнему с достаточно высокой точностью удается идентифицировать представителей видов *S. auricularis*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, и *S. schleiferi*. Несколько увеличилась, но не превысила 50% уровня точность идентификации *S. simulans* и *S. xylosum*, что может объясняться «размытостью» комплекса их таксономически значимых характеристик.

С целью определения причин, приведших к относительной неэффективности панели «STAPHYtest-8» и определивших рост идентификационных возможностей «STAPHYtest-16», а также поиска возможных путей дальнейшего совершенствования этих и подобных тест-систем на завершающем этапе исследования нами был осуществлен анализ информативности отдельных входящих в их состав диагностических тестов (таблица).

Полученные данные позволили выразить информативность каждого из конвенциональных таксономически значимых признаков стафилококков в числовой форме и расположить их по мере убывания от признака образования кислоты в аэробных условиях из маннозы (информативность $I=30,08$) до способности к росту в аэробных условиях ($I=0,001$). При этом в изученной группе свойств были определены 19 признаков с максимальной информативностью ($I>20$), каковые в наибольшей степени пригодны для целей межвидовой идентификации стафилококков и являются потенциальными кандидатами для включения в состав соответствующих идентификационных тест-систем.

Анализ их присутствия в составе панели «STAPHYtest-8» позволил констатировать использование пяти высокоинформативных признаков: щелочной фосфатазы ($I=29,75$), продукции ацетона ($I=25,87$), уреазы ($I=27,47$), образования кислоты в аэробных условиях из трегаллозы ($I=21,45$) и маннитола ($I=20,67$). В совокупности с ними в состав данной системы входили тесты с менее выраженной информативностью: образование кислоты в аэробных условиях из сахарозы ($I=19,58$) и восстановление нитратов ($I=19,39$). Как уже указывалось выше, тест на образование кислоты из глицерина, входящий в системе «STAPHYtest-8», не используется для межвидовой дифференциации стафилококков и потому имеет нулевую информативность, а тест на каталазу по данному параметру ($I=7,50$) среди 36 конвенциональных тестов занимает предпоследнее место. Совокупность данных причин, связанных с небольшим набором используемых дифференцирующих тестов и низкой информативностью некоторых из них, результировалось в невысокой сум-

Таблица. Информативность признаков, используемых для межвидовой дифференциации стафилококков

Дифференцирующие признаки	Информативность	STAPHYtest-8	STAPHYtest-16
Размер колоний (крупный)	27,24	-	-
Образование пигмента	19,09	-	-
Рост в анаэробных условиях	17,04	-	-
Рост в аэробных условиях	0,001	-	-
Плазмокоагулаза	18,25	-	-
Клампинг-фактор	12,39	-	-
Термостабильная нуклеаза	20,80	-	-
Гемолизины	21,07	-	-
Каталаза	7,50	+	-
Оксидаза	14,64	-	+
Щелочная фосфатаза	29,75	+	+
Аргининариламидаза	9,69	-	-
Пирролидонилариламидаза	21,73	-	+
Орнитиндекарбоксилаза	10,53	-	+
Уреаза	27,47	+	+
в-глюкозидаза	21,65	-	-
в-глюкуронидаза	21,40	-	+
в-галактозидаза	24,04	-	+
Утилизация аргинина	25,38	-	+
Продукция ацетона	25,87	+	+
Восстановление нитратов	19,39	+	+
Гидролиз эскулина	17,11	-	+
Устойчивость к новобиоцину	29,66	-	+
Устойчивость к полимиксину	18,79	-	-
D – трегалоза	21,45	+	+
D – маннитол	20,67	+	+
D – манноза	30,08	-	+
D – тураноза	22,15	-	-
D – ксилоза	20,16	-	+
D – целлобиоза	14,06	-	-
L – арабиноза	14,48	-	-
Мальтоза	23,40	-	+
б- лактоза	18,11	-	-
Сахароза	19,58	+	+
N – ацетилглюкозамин	21,69	-	-
Раффиноза	13,27	-	-
Суммарная информативность	699,58	171,68	402,31

марной информативности системы «STAPHYtest-8» ($UI=171,68$), что проявилось в ее слабой диагностической эффективности – только $44,83\pm 5,33\%$ правильных результатов идентификации.

Модификация данной тест-системы, приведшая к формированию панели «STAPHYtest-16», выразилась в введении в ее состав десяти новых дифференцирующих тестов, среди которых восемь (в-галактозидаза, в-глюкуронидаза, пирролидониламидаза, устойчивость к новобиоцину, аргинин, образование кислоты в аэробных условиях из маннозы, ксилозы и мальтозы) относятся к высокоинформативным. В итоге суммарная информативность всей тест-системы возросла почти в два с половиной раза и составила $UI=402,31$, что результировалось в повышении ее диагностической эффективности до $73,83\pm 3,6\%$. Вместе с тем подобная суммарная информативность составляет лишь $57,5\%$ от общей суммарной информативности всех 36 конвенциональных тестов ($UI=699,58$), в результате чего эффективность тест-системы «STAPHYtest-16» оказывается еще достаточно далека от уровня 95-99%, что позволило бы говорить о ней как о соответствующей требованиям «золотого стандарта».

Анализ информативности конвенциональных тестов, не вошедших в состав панели «STAPHYtest-

16», позволил констатировать присутствие среди них трех высокоинформативных - в - глюкозидазы (I=21,65), способностей к продукции кислот в аэробных условиях из туранозы (I=22,15) и N-ацетилглюкозамина (I=21,69), что определяет перспективность их использования при будущей возможной модернизации данной тест-системы. Следует указать также на целесообразность дополнительного определения у идентифицируемых микроорганизмов таких биологических характеристик как способность к

образованию термостабильной ДНК-азы (I=20,80) и продукции гемолизина (I=21,07), что и без принципиального пересмотра идентификационной тест-системы позволит повысить ее дифференцирующую эффективность. В то же время неочевидным представляется продолжение использования тестов на орнитиндекарбоксилазу и оксидазу, которые по своей информативности (соответственно I=10,53 и I=14,64) значительно уступают прочим, используемым в системе «STAPHYtest-16».

Список использованной литературы:

1. Фот Н.П., Бравичева О.С. Видовая идентификация микроорганизмов рода стафилококков с применением методов кластер-анализа. – Вестник ОГУ. – 2002. - №3 – С.132-135.
2. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Пер с англ. / Под ред. Дж.Хоума, Н.Крига, П.Снита и др. – М.: Мир, 1997.
3. Айвазян С.А. Мхитарян В.С. Прикладная статистика и основы эконометрики. – М.: "ЮНИТИ-ДАНА", 2001 – 656 с.
4. Кульбак С. Теория информации и статистика. – М.: Наука, 1967.
5. Дерябин Д.Г. Стафилококки: экология и патогенность. – Екатеринбург: УрО РАН, 2000.
6. Perl T.M., Rhomberg P.R., Bale M.J. et al. Comparison of identification system for Staphylococcus epidermidis and other coagulase-negative Staphylococcus species // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 1994. – V.18. – N3. – P.151-155.
7. Grant C.E., Sewell D.L., Pfaller M. Et al. Evaluation of two commercial systems for identification of coagulase-negative staphylococci to species level // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 1994. – V.18. – N1. – P.1-5.