

*На правах рукописи*

Каргальцева Наталья Михайловна

**СОВРЕМЕННАЯ КУЛЬТУРОМИКА – ПУТЬ ПОВЫШЕНИЯ  
ЭФФЕКТИВНОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ИНФЕКЦИИ КРОВОТОКА**

1.5.11. – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научные консультанты:**

Доктор медицинских наук, профессор  
Доктор медицинских наук, профессор

**Кочеровец Владимир Иванович**  
**Борисова Ольга Юрьевна**

**Официальные оппоненты:**

**Афиногенов Геннадий Евгеньевич** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», кафедра челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии, профессор; эксперт по клинической микробиологии городской клинико-экспертной комиссии Комитета по здравоохранению Санкт-Петербурга

**Кветная Ася Степановна** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» Федерального медико-биологического агентства России, научный отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, ведущий научный сотрудник

**Попов Дмитрий Александрович** – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория клинической микробиологии и антимикробной терапии, заведующий

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Уфа)

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01. при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

В настоящее время инфекции при терапевтических заболеваниях являются актуальной проблемой, включая инфекцию кровотока, которая не включена в международную классификацию болезней (МКБ-10, МКБ-11), но осложняет пневмонию до 63,2% (Лычев В.Г. и др., 2012; Полибин Р.В. и др., 2017; Murohashi K. et al., 2019), фарингит (Alexandre M. et al., 2017), целлюлит, заболевания мочевыводящих путей до 30,9% (Velasco M. et al., 2003; Greene M.T. et al., 2012; Kwon H.J. et al., 2015), периодонтит до 42,5% (Недосека В.Б. и др., 2002; Dhotre S. et al., 2018), некротизирующий энтероколит (Raphael B.P. et al., 2015), травму (Laupland K. et al., 2004); 20% больных в блоке интенсивной терапии имеют осложнение в виде инфекции кровотока (Bharadwaj R. et al., 2014; Timsit J-F. et al., 2020). В период эпидемии COVID-19 регистрируют эпизоды инфекции кровотока до 34,1% случаев (Bhatt P.J. et al., 2021; Sogaard K.K. et al., 2021) и в сочетании с пневмонией (Paramanoli A. et al., 2020).

Уровень летальности при инфекции кровотока в мире растет в зависимости от географии стран: до 48% в странах Европы (Paulsen J. et al., 2015; Mc Namara J.K. et al., 2018; Robineau O. et al., 2018), до 18,1% – в странах Африки (Reddy E.A. et al., 2010) и от основного заболевания: до 49% случаев у онкогематологических больных (Багирова Н.С., 2003; Lillie P.J. et al., 2013; Чеботкевич В.Н. и др., 2016; Mc Namara J.K., et al., 2018), до 33% – при заболеваниях мочевыводящих путей (Greene M.T. et al., 2012; Daga A.P. et al., 2019), до 37% – при целлюлите (Tay E.Y., et al., 2014; Navadeep R.K. et al., 2017). Летальность отличается и по видам инфекции кровотока: при госпитальной инфекции кровотока она составляет 26%, инфекции кровотока, ассоциированной с оказанием медицинской помощи – 19%, внегоспитальной инфекции кровотока – 16% случаев (Lenz R. et al., 2012; Koch A.M. et al., 2015). В блоке интенсивной терапии летальность может достигать 80% случаев (Sato A. et al., 2017). В России генерализованная форма катетер-ассоциированной инфекции кровотока имеет летальность до 18% случаев (Бережанский Б.В. и др., 2006; Квашнина Д.В. и др., 2017). При повторных эпизодах бактериемии отмечали летальность до 34% случаев (Jensen U.S. et al., 2011).

Средний результат получения гемокультур в России по приказу МЗ СССР № 535 от 1985 г. составляет 20,0% (Диденко Л.В., 2001; Карапац М.М., 2002; Свистунов С.А. и др., 2012; Щетинкина Е.Е. и др., 2014) и при использовании автоматизированных гемокультуральных систем – 13,4% (Грувер К.П. и др., 2010; Честнова Т.В. и др., 2012; Полухина О.В. и др., 2014; Арефьева Л.И. и др., 2015; Багирова Н.С., 2015; Татульян А.А. и др., 2016; Киселева Е.Е., 2017). По данным зарубежных авторов уровень диагностики инфекции кровотока на автоматизированных гемокультуральных системах достигает от 3% до 43,7% (Laupland K.V. et al., 2005; Dargene S. al., 2014; Li G. et al., 2019; Nestor D. et al., 2021), при использовании ручных методов – до 2% (Carl van Walraven et al., 2014). Полуавтоматические системы мало эффективны для роста стрептококков, грамотрицательных палочек, грибов (Sogaard M. et al., 2011). Отмечают низкий диагностический уровень ручных методов исследования крови и большой разброс в получении гемокультур при использовании автоматизированных методов гемокультуривирования как в России, так и за рубежом (Opota O et al., 2015).

В России основой питательных сред является панкреатический гидролизат рыбной муки (Шепелин А.П., 2011) и промышленное производство высокопитательной сердечно-мозговой среды отсутствует. Диагностика инфекции кровотока не предусматрива-

ет применение экспресс-методов получения гемокультуры и экспрессное выявление микроорганизмов в крови.

Таким образом, причиной высокой летальности при инфекции кровотока при терапевтической патологии является низкий уровень диагностической эффективности гемокультуривирования вследствие недостаточных знаний принципов культивирования крови и отсутствия унифицированной системы микробиологического исследования крови. Поэтому назрела необходимость расширить традиционные микробиологические методы исследования крови, применить приемы микробиологической культуромики (Lagier J.C. et al., 2012; Lagier J.C., 2015; Lagier J.C. et al., 2018). В 21 веке на микробиологические лаборатории возложена роль оптимизации диагностики инфекционных заболеваний, включая инфекцию кровотока (Fournier P.E. et al., 2013; Hansen G.T., 2016; Peri A.M. et al., 2021).

### **Степень разработанности темы исследования**

В России инфекция кровотока изучается у онкогематологических больных (Щетинкина Е.Е. и др., 2014; Багирова Н.С., 2015; Чеботкевич В.Н. и др., 2016), при катетер-ассоциированной инфекции (Козлов Р.С. и др., 2010), послеоперационных осложнениях (Арефьева Л.И. и др., 2015; Плотник Л.Л. и др., 2015), травмах (Свистунов С.А. и др., 2012). Имеются публикации по диагностике бактериемии у больных в многопрофильном стационаре (Грувер К.П. и др., 2010; Гусаров В.Г. и др., 2017) и о роли инфекции в кровотоке при атеросклерозе (Руф Р.Р., 2015). Опубликовано применение ПЦР для определения генов устойчивости и индикации микроорганизмов в крови (Попов Д.А. и др., 2011; Вершинина М.Г. и др., 2016; Киселева Е.Е., 2017).

Однако, при диагностике таких заболеваний, как гематогенный остеомиелит, приводящий к инвалидизации пациентов до 90% случаев, микробиологическое исследование крови в России не проводят (Котельников Г.П. и др., 2009; Гаркавенко Ю.Е. и др., 2013; Миронов С.П. и др., 2019; Цыбин А.А. и др., 2019), зарубежные исследователи получают до 50% положительных гемокультур и считают посев крови обязательным диагностическим этапом при данном заболевании (Fritz J.M. et al., 2008; Bae J.Y. et al., 2018; King R.W. et al., 2019; Schmitt S., 2020; Momodu J.J. et al., 2021).

Подобная ситуация обстоит с инфекцией кожи и мягких тканей, так как микробиологические исследования крови не включены в Российские национальные рекомендации и на практике не используют (Савельев В.С. и др., 2009; Гельфан Б.Р. и др., 2015; Белобородов В.Б., 2017), они применяются в зарубежных руководствах (Stevens D.L., et al., 2014), при осложненном варианте заболевания, получая до 23,6% положительных гемокультур (Malone J.R. et al., 2013; Halavaara M. et al., 2019).

В мировой литературе показаны разные характеристики инфекции кровотока: случаи возвратных эпизодов, этиопатогенез, эпидемиологические подходы, технические возможности и молекулярно-генетические методы диагностики, также представлены данные по инфекции кровотока при COVID-19 (Al-Hasan M.N. et al., 2010; Jensen U.S. et al., 2011; Patel R. et al., 2011; Baron E.J. et al., 2013; Kirn T.J. et al., 2013; Wojewoda C.M. et al., 2013; Laupland K.B. et al., 2014; Marin M. et al., 2014; Huson M.A.M. et al., 2014; Opota O. et al., 2015; Lamy V. et al., 2016; Mehl A. et al., 2017; Lee J. et al., 2017; Parize P. et al., 2017; Florio W. et al., 2018; Ombelet S. et al., 2019; Giacobbe D.R. et al., 2020; Adelman M.W. et al., 2021; Bonazzetti C. et al., 2021; Sogaard K.K. et al., 2021).

Для выявления в крови трудно культивируемых и некультивируемых микроорганизмов за рубежом исторически применяют метод микроскопического исследования мазка крови (Parsons R.J. et al., 1945; Anderson A.O. et al., 1974; Graham B.S. et al., 1984; Berrouane Y. et al., 1998; Kaminami K.N.K. et al., 2011; Hirai Y. et al., 2015; Agarwal P.,

2018; Leitaо T.M.J.S. et al., 2019).

Анализ опубликованных отечественных и зарубежных данных показал, что в России отмечается односторонний подход к проблеме инфекции кровотока и слабо освещается патогенетическая связь с терапевтическими заболеваниями. Таким образом, назрела потребность расширить у клинических микробиологов теоретические и практические знания с целью улучшения качества диагностики инфекции кровотока, где основной задачей является системный подход к микробиологическому исследованию крови.

### **Цель работы:**

На основе инновационных принципов микробиологической культуромики разработать современную модель исследования гемокультуры с целью повышения информативности клинико-микробиологической диагностики инфекций кровотока у пациентов с терапевтическими заболеваниями.

### **Задачи исследования:**

1. Внедрить инновационные принципы микробиологической культуромики в процесс клинико-лабораторной диагностики инфекции кровотока у терапевтических пациентов.

2. На основе адаптированных схем и методов микробиологической культуромики повысить информативность этиологической диагностики бактериемий и других проявлений инфекции кровотока.

3. Провести сравнительное изучение и определить диагностическое значение микробиологических, масс-спектрометрических, молекулярно-генетических и других клинико-лабораторных маркёров при обследовании пациентов с признаками инфекции кровотока.

4. Разработать отечественные образцы высокопитательных сред с целью повышения эффективности методов культуромики при исследовании гемокультур.

5. Предложить современный алгоритм интегральной диагностики инфекций кровотока у терапевтических пациентов с учётом инновационных принципов микробиологической культуромики и сопутствующих маркёров клинико-лабораторного профиля применительно к практическим задачам лечебно-профилактических организаций Российской Федерации.

### **Научная новизна**

Впервые на основе применения инновационных принципов микробиологической культуромики и научного многопланового обследования пациентов разработана универсальная модель получения гемокультуры и система информативной микробиологической диагностики инфекции кровотока на базе комплекса технологических решений, которые расширят границы микробиологического исследования крови при любой патологии.

Впервые обосновано использование мультифакторной системы, основанной на принципах адаптированных схем и методов микробиологической культуромики для получения гемокультуры с применением: закрытой анаэробной системы, анаэробных газовых условий, сердечно-мозговой питательной среды, оптимального соотношения объёма крови к питательной среде, позволяющей получить новые данные о видовой структуре бактериемий и фунгемий, расширить микробиологические знания по этиологической диагностике инфекции кровотока.

Установлено, что симптоматические, гематологические и сывороточные клинико-лабораторные показатели воспаления обладают диагностическими и прогностическими функциями маркёров инфекции кровотока у терапевтических пациентов.

Впервые разработан метод получения гемокультуры на основе посева лейкоцитарного слоя пробы периферической крови с высокой эффективностью выделения возбудителей из крови при использовании минимального объёма отбираемой крови (4,5 мл) и достаточного транспортного временного резерва от момента взятия крови до исследования (4 часа) (Патент на изобретение РФ № 2098486 от 10.12.1997).

Впервые разработана рецептура и апробированы отечественные сердечно-мозговые питательные среды (жидкая и плотная), повышающие эффективность методов микробиологической культуромики при исследовании гемокультур и качество диагностики инфекции кровотока (Патенты на изобретение РФ № 2650863 от 13.02.2017., № 2660708 от 29.09.2017.).

Впервые предложены пути повышения диагностической информативности инфекции кровотока путем микроскопии мазка лейкоцитарного слоя пробы крови, используя классическую технику приготовления мазка «двух стекол» и техники «осветления» (Патент на изобретение РФ № 2616249 от 20.01.2016).

Впервые разработана методика nested-ПЦР из лейкоцитарного слоя пробы крови, позволяющая выявлять ДНК микроорганизмов и их Грам-принадлежность, что дает возможность интегрировать ее в систему диагностики инфекции кровотока.

Впервые проведено полногеномное секвенирование штамма *Aerococcus spp.* 1КР-2016, выделенного из крови пациента с инфекцией кровотока, и получен драфтовый сиквенс генома. Нуклеотидная последовательность штамма депонирована в международную базу данных NCBI/GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NEEY00000000>).

Предложен многофункциональный алгоритм интегральной диагностики инфекции кровотока для пациентов с терапевтическими заболеваниями, который основан на инновационных принципах микробиологической культуромики с применением комплекса микроскопических, бактериологических, масс-спектрометрических и молекулярно-генетических методов и сопутствующих клинико-лабораторных маркёров.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Разработанная универсальная модель получения гемокультуры и примененная информативная клинико-микробиологическая система исследования крови дали новые теоретические знания о механизмах развития инфекции кровотока при соматических заболеваниях, совершенствовании способов культивирования микроорганизмов в искусственных условиях роста. Теоретические знания культивирования крови значительно расширяют практические возможности микробиологических лабораторий по выделению возбудителей из крови, дополняют представления клиницистов о роли инфекции при соматических заболеваниях.

Впервые создана универсальная модель получения гемокультуры и научно обоснована информативная система микробиологической диагностики инфекции кровотока, включающая алгоритмы микробиологического исследования крови, разработанные для практического обследования стационарных и амбулаторных терапевтических больных, учитывающая технические возможности любой лаборатории федерального и регионального уровней страны.

Научно обоснованная система микробиологического исследования крови является теоретически и практически конструктивным принципом диагностики инфекции кровотока, расширяющим научные и практические возможности и повышающим диагностический уровень выявления инфекции в кровотоке на ступень доступного использования.

С применением инновационных принципов микробиологической культуромики, включающей микроскопические, бактериологические, масс-спектрометрические и мо-

лекулярно-генетические методы исследования, повышена информативность клинико-лабораторной диагностики инфекций кровотока у пациентов терапевтического профиля.

Полученные данные по этиологической структуре возбудителей инфекции кровотока при соматических заболеваниях являются новой микробиологической информацией, на основе которой разработаны критерии этиологической оценки и показана роль грамположительной инфекции при соматической патологии, на основании чего можно практически обосновать подбор адекватной антимикробной терапии больным инфекцией кровотока в лечебно-профилактических организациях любого уровня.

Обоснована теоретически и подтверждена практическими результатами ценность симптоматических, гематологических, биохимических показателей воспаления в роли диагностических маркеров инфекции кровотока у терапевтических больных.

Разработанные отечественные сердечно-мозговые среды (жидкая и плотная) показали высокую питательную ценность и эффективность при выделении моно- и полимикробных гемокультур в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях, расширили видовой спектр возбудителей инфекции кровотока. Создание рецептуры отечественных сердечно-мозговых сред позволит расширить ассортимент выпускаемых отечественных сред и выполнить государственную задачу по импортному замещению зарубежных питательных сред в отечественном практическом здравоохранении.

Использование техники микроскопии мазков лейкоцитарного слоя пробы крови при диагностике инфекции кровотока: «пробирочный метод» с диагностической эффективностью в 65,9%, «шприц-пробирка» – в 100% и метод «осветление» мазка для увеличения выявления грамотрицательных микроорганизмов до 94,3%, позволяет выявлять возбудителей в крови в течение 2-х часов с момента поступления пробы крови и повышать информативность обнаружения бактериально-дрожжевых ассоциаций при отсутствии их роста в гемокультуре. Микроскопия мазка крови разрешает осуществить раннюю диагностику циркулирующих микроорганизмов в кровотоке, способствует практической оптимизации диагностики инфекции кровотока при минимальных технико-материальных и экономических затратах медицинских организаций.

Разработанный метод получения гемокультуры на основе прямого посева лейкоцитарного слоя пробы крови показал эффективную лабораторную диагностику инфекции кровотока при использовании небольшого объема крови и минимального количества проб, сокращение времени получения результата и отсутствие необходимости закупать дорогие импортные гемокультуральные автоматизированные системы и флаконы к ним для гемокультивирования. Разработанный метод получения гемокультур позволяет использовать масс-спектрометрические методы для идентификации выросших культур на плотной среде и получить ответ на второй день поступления крови в лабораторию.

Штаммы микроорганизмов, выделенные из крови: *Aerococcus spp.* 1КР-2016, *Brevibacillus borstelensis*, *Rothia mucilaginosa* депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск) (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора) и могут быть использованы для проведения научных исследований при изучении этиопатогенеза инфекции кровотока.

Создана коллекция штаммов и образцов ДНК микроорганизмов, выделенных из крови, с целью дальнейшего изучения особенностей их биологических свойств, позволяющих им циркулировать в крови.

Алгоритмы диагностики инфекции кровотока представлены в методических рекомендациях «Инфекционный эндокардит» (диагностика, лечение, профилактика) (Министерство здравоохранения и Медицинской промышленности РФ, 1994 г.), «Микробиологические методы диагностики инфекции кровотока» (Комитет по здравоохра-

нению Санкт-Петербурга, 2009 г.), «Микробиологические методы диагностики инфекции кровотока» (Комитет по здравоохранению Санкт-Петербурга, 2-е издание, 2010 г.)

Рекомендации с целью повышения лабораторной эффективности при индикации инфекции кровотока внедрены в практическую работу в Референтной лаборатории МЗ Пермского края при МУЗ ГKB №7, г. Пермь (акт внедрения от 20.11.2008 г.), ООО «НИЛ Диагностика» при институте Экспериментальной Медицины РАМН, г. Санкт-Петербург (акт внедрения от 22.11.2012 г.), в лаборатории медицинского центра «Иридалаб», г. Мариуполь, Донецкая область, Украина (акт внедрения от 12.06.2021 г.), в лаборатории Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны РФ, г. Санкт-Петербург (акт внедрения от 02.07.2021 г.), в гнойно-септическом отделе специализированной централизованной бактериологической лаборатории при СПб ГБУЗ «Городская поликлиника №75», г. Санкт-Петербург (акт внедрения от 02.07.2021 г.), в научных исследованиях в рамках отраслевой научно-исследовательской программы «Проблемно-ориентированные научные исследования в отрасли эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями на 2016-2020 гг.» ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, г. Москва (акт внедрения от 24.11.2021 г.). Метод микроскопии мазка крови внедрен при обследовании больных острым перитонитом «Способ экспрессной диагностики состояния бактериемии у больных острым разлитым перитонитом» (рационализаторское предложение № 182 от 2000 г.) и менингитом «Способ микроскопического исследования лейкоцитарного периферического крови как метод экспрессной диагностики бактериального менингита» (рационализаторское предложение № 183 от 2000 г.).

### **Методология и методы исследования**

Объектом исследования служили госпитальные больные кардиологического профиля и внегоспитальные терапевтические пациенты. Предметом исследования являлись пробы цельной крови и лейкоцитарного слоя периферической крови. Культуральные исследования крови включали посев цельной крови, лейкоцитарного слоя крови, материала «кровь-среда» в разных газовых условиях культивирования. Микроскопические исследования состояли из просмотра мазков цельной крови, лейкоцитарного слоя крови и материала «кровь-среда». Оценивали симптоматические, гематологические и биохимические показатели воспаления в роли маркеров инфекции кровотока (ИК). Изучили симптоматические, гендерные, возрастные маркеры прогноза ИК, культурально-морфологические и биохимические свойства возбудителей, молекулярно-генетические методы индикации и идентификации микроорганизмов. Все исследования одобрены локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол № 28 от 18.11.2014 г.).

### **Материалы исследования**

**Пациенты.** В исследование 1985–2019 гг. включены: группа госпитальных больных, сформированная на базе ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России совместно с врачами-кардиологами института и группа внегоспитальных пациентов, которая формировалась по направлениям клиницистов из лечебно-профилактических организаций (ЛПО): «Центр по лечению хирургических инфекций» СПб ГБУЗ городская больница № 5, г. Санкт-Петербург; Центр пластической хирургии ООО «Эскувер», г. Санкт-Петербург; Стоматологический центр ЗАО «Иреко-Dental»; СПб ГБУ Детская городская больница № 2 Святой Марии Магдалины, г. Санкт-Петербург; Центр пластической хирургии ООО «Клиника Данищука», г. Москва на исследование крови пациентов в СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 75» специализированную централизованную бактериологическую лаборато-

рию, клинико-диагностический центр (КДЦ) ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора и ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ России. Общее количество 1230 обследованных больных с подозрением на эпизоды ИК включало 848 госпитальных с кардиологическими диагнозами и 382 внегоспитальных пациентов с различными диагнозами.

**Коллекционные и свежевыделенные штаммы микроорганизмов**, использованные в работе: *Corynebacterium ulcerans* № 675, *Corynebacterium xerosis* № 1911, *Bordetella pertussis* № 143, *Bordetella bronchiseptica* № 9 («ГКПМ-ОБОЛЕНСК» (ФБУН ГНЦПМБ Роспотребнадзора)); *Corynebacterium minutissimum* ATCC 23348, *Corynebacterium jeikeium* ATCC 43734, *Bordetella holmesii* ATCC 51541, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, *Candida albicans* ATCC 10231 (American Type Culture Collection, National Collection of Type Cultures), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria mucosa*, *Rothia mucilaginosa*, *Bacillus cereus* (рабочая коллекция лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора).

**Биологический материал.** Исследовано 2075 проб цельной крови и лейкоцитарного слоя периферической крови. Взятие крови и транспортировка производилась в процедурных кабинетах ЛПО с соблюдением правил асептики и согласно правилам официальных документов. У госпитальных больных кровь отбирали однократно, двукратно или более раз, у внегоспитальных – однократно или двукратно.

#### Методы исследования

##### Микробиологические методы исследования

###### Микроскопические методы

В соответствии с Приказом МЗ СССР № 535 готовили «толстый» мазок в виде капли крови на предметном стекле, окрашивали по Граму («капельный» метод). Для «пробирочного» метода в лаборатории готовили центрифужную пробирку с 0,5 мл 5% лимоннокислого натрия, добавляли 4,5 мл цельной крови, после центрифугирования наносили капли лейкоцитарного слоя на предметное стекло, делали мазок техникой «двух стекол», окрашивали по Граму. Материал «кровь-среда» из флаконов отбирали на предметное стекло, растирали по форме овала, окрашивали по Граму (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Мазки микроскопировали при помощи МИКРОМЕД-1 (объектив МИ 90-1,25; окуляр К 7\* (ЛОМО, Россия)) и Axio Scope A1 (объектив EC Plan-NEOFLUAR 100 x 1,3; окуляр PI 10 x 23 Br foc (Carl Zeiss, Германия)).

###### Бактериологические методы

Культуральное исследование цельной крови проводили в соответствии с Приказом МЗ СССР № 535, МР «Принципы бактериологического исследования крови больных инфекционным эндокардитом» (МЗ РФ, 1990 г.), «Микробиологические методы диагностики инфекции кровотока» (Комитет по здравоохранению Санкт-Петербурга, 2010 г.). У больных отбирали 10 мл крови шприцом, использовали 1% сахарный бульон, тиогликолевую среду, «среду для контроля стерильности», «двойную среду», приготовленные в лабораторных условиях, соотношение крови к среде как 1:10, инкубировали 7–10 дней в аэробных условиях при температуре + 37° С.

Метод субкультивирования гемокультур предусматривал высев материала «кровь-среда» на 5% кровяной мясо-пептонный агар (МПА) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), культивирование в аэробных условиях при температуре + 37° С для получения чистой культуры, идентификацию и определение устойчивости к антибиотикам. «Сле-

пое» субкультивирование проводили на 10-й день культивирования флаконов без видимого роста микроорганизмов. Флаконы инкубировали до 6 недель, учитывая наличие медленно растущих микроорганизмов в пробе крови.

**Идентификация выросших микроорганизмов.** Культуральные свойства выросших микроорганизмов изучали с помощью стереоскопических микроскопов МСП-1 (ЛОМО, Россия) и SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss, Германия) (объектив PlanApo S 1,0× FWD 60 mm; окуляр PI 10 x 23 Bf foc). Культуральные свойства оценивали по характеру и размерам колоний, наличию гемолиза. Биохимические свойства основывались по выявлению ферментативной, сахаролитической и протеолитической активности с помощью тест-систем: набор реагентов «ДС-ДИФ-СТАФИ-16» (НПО «Диагностические системы», Н. Новгород), «СТАФИ тест-16», «СТРЕПТО тест-16» (ERBA Lachema, Чехия), и на средах, приготовленных в лабораторных условиях согласно Приказу МЗ СССР № 535.

Идентификацию микроорганизмов проводили при помощи бактериологического анализатора Auto SCAN-4 (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия).

Видовую идентификацию микроорганизмов проводили методом времяпролётной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией / ионизацией (MALDI-ToF MS) с использованием VITEK<sup>®</sup> MS (bioMérieux, Франция) и анализатора микробиологического «VactoSCREEN».

#### **Молекулярно-генетические методы исследования**

Выделение хромосомной ДНК проводили методом кипячения и из крови с помощью набора реагентов «РИБО-сорб» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Метод *16S rRNA* типирования проводили путём амплификации фрагментов гена *16S rRNA* в соответствии с опубликованными протоколами (Mathieu A. et al., 2013) и с использованием амплификатора «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле в 50 TAE-буфере и далее визуализировали с помощью гельдокументирующей системы Quantum-ST4-1100/26M (Vilber Lourmat, Франция).

Очистку ПЦР-продуктов и их секвенирование, полногеномное секвенирование проводили на базе ЗАО «Евроген» (Москва, Россия) (<http://evrogen.ru/>).

#### **Клинико-лабораторные методы исследования**

Из методов общего гематологического анализа учитывали подсчет количества эритроцитов, лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, количества гемоглобина, скорость оседания эритроцитов. Анализы выполняли в ручном и автоматическом режимах. Для биохимических исследований использовали взятие венозной крови в пробирки и вакутейнеры, содержащие различные варианты активаторов свертывания, стабилизирующие добавки для получения плазмы.

#### **Методы доказательной медицины**

Использовали операционные характеристики диагностических методов исследования. Строили матрицу для вычисления операционных характеристик в виде 4-х-польной таблицы, вычисляли по формулам аналитические параметры диагностического теста: чувствительность ( $a / (a+c)$ ), специфичность ( $d / (b+d)$ ), точность ( $(a+d) / (a+b+c+d)$ ), прогноз положительного результата (ППР+) ( $a / (a+b)$ ), прогноз отрицательного результата (ПОР-) ( $d / (c+d)$ ).

#### **Биоинформатические и статистические методы исследования**

Подбор специфичных олигонуклеотидных праймеров и вычисление их температуры отжига проводили с помощью программ PerlPrimer 1.1.21 и Geneious 4.8.5. Проверку специфичности праймеров выполняли с помощью программы BLAST

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Результаты секвенирования обрабатывали с использованием программы Geneious 4.8.5 для дальнейшего сопоставления с данными в международной базе данных EMBL / GenBank на сайте (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Анализ полногеномного сиквенса выполняли с помощью программ NCBI BLAST и программы автоматической аннотации генома RAST (<https://rast.nmpdr.org/>). Результаты обрабатывали с помощью программы Quantity One (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ STATISTICA, ver. 10 (StatSoft, Лиц. ВХХR310F964808FA-V). Интервальные оценки распределения частот качественных показателей представлены 95% доверительными интервалами (ДИ), вычисляемыми методом Вилсона (Wilson). Сравнительный анализ частот (долей) в группах исследования проведён с помощью критерия  $\chi^2$  (хи-квадрат) Пирсона, при его неустойчивости использован точный критерий Фишера или  $\chi^2$  с поправкой Йетса. В качестве порогового уровня значимости принимали стандартное значение  $p=0,05$ . Для визуализации полученных результатов использованы графические средства пакета Microsoft Office.

Всего было выполнено 19195 исследований (Таблица 1).

Таблица 1 – Показатели, методы и объём исследований

Показатели	Методы	Количество исследований
<b>Характеристика больных</b>		
Анамнестические данные	Сбор анамнеза и жалоб в разработанные анкеты	1230
<b>Микроскопические исследования</b>		
Морфологические и тинкториальные свойства	Микроскопии лейкоцитарного слоя крови	2574
	Микроскопии материала «кровь-среда»	1594
	Осветление мазка	33
<b>Бактериологические исследования</b>		
Получение гемокультуры и видовая идентификация микроорганизмов	Посев крови во флакон с жидкой средой	1594
	Посев лейкоцитарного слоя на питательный агар с инкубированием в аэробных и анаэробных условиях	962
	Посев материала «кровь-среда»	4629
Экспериментальные	Культивирование факультативно-анаэробных микроорганизмов в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях	1275
	Посев крови на сахарный бульон, СКС и СМС	780
	Посев материала «кровь-среда» на 5% МПА и СМА с культивированием в аэробных условиях	600
	Посев материала «кровь-среда» на 5% МПА и СМА с культивированием в анаэробных условиях	600
<b>Масс-спектрометрические исследования</b>		
Идентификация микроорганизмов	Масс-спектрометрический	300
<b>Молекулярно-генетические исследования</b>		
Индикация и идентификация микроорганизмов	Полимеразная цепная реакция	157
	Метод <i>16S rRNA</i> типирования	157
	Nested-ПЦР	26
	Секвенирование <i>16S rRNA</i>	157
	Полногеномное секвенирование	1
<b>Клинико-лабораторные исследования</b>		
Гематологические	Определение количества эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, уровня СОЭ	1914
Биохимические	Определение уровней СРБ, фибриногена, общего белка, А/Г коэффициента, $\alpha_2$ -глобулина, $\gamma$ -глобулина	612

### Личное участие автора в получении результатов

Автором определена основная идея исследования, разработаны задачи и методы для реализации поставленной цели, сбор и анализ литературных данных. Автор лично

выполнил весь объём микроскопии, все бактериологические исследования госпитальных больных. Бактериологические исследования крови внегоспитальных пациентов выполнены совместно с сотрудниками специализированной централизованной бактериологической лаборатории СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 75» к.м.н. Е. В. Сапроновой и Е. А. Петрачковой; конструирование праймеров и анализ полногеномного сиквенса – совместно с к.м.н. А. В. Чаплиным – сотрудником лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора; масс-спектрометрические исследования – совместно с профессором кафедры микробиологии, вирусологии ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, д.м.н., профессором Б. А. Ефимовым; молекулярно-генетические и масс-спектрометрические исследования – совместно с сотрудниками лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, к.м.н. Н.Т. Гадуа, к.м.н. А. С. Пименовой и к.м.н. И. А. Чагиной. Автор провел статистическую обработку, определил выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Применение современных принципов культуромики существенно влияет на информативность микробиологической диагностики инфекции кровотока.

2. Разработанная модель исследования гемокультуры при этиологической диагностике инфекций кровотока позволяет в 41,3% случаев получить микробиологическое подтверждение циркуляции микроорганизмов в кровотоке у пациентов с терапевтическими заболеваниями.

3. Предложенные методы и приемы обнаружения и выделения микроорганизмов из крови с помощью прямой визуализации, применения высокопитательных сред, масс-спектрометрического и молекулярно-генетического методов обеспечили частоту обнаружения микроорганизмов в пробах крови в 75,4% случаев и получение положительных гемокультур в 48% случаев.

4. Сложный генез многих терапевтических заболеваний, сопровождающихся инфекцией кровотока, требует применения принципов интегральной диагностики и результатов широкого спектра клинико-лабораторных методов. При этом установлено, что маркеры воспаления из числа симптоматических, гематологических и биохимических показателей являются ценными прогностическими признаками инфекции кровотока.

5. Исследования крови, проведенные с учетом принципов современной культуромики, выявили доминирующее положение грамположительных факультативно-анаэробных кокков, представленных преимущественно группой коагулазоотрицательных стафилококков, из которых *S.epidermidis* составил 74,0%.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Реализация поставленных задач основывалась на методологии микробиологической культуромики, как современного направления в микробиологической лабораторной диагностике. Достоверность полученных результатов получена за счет исследования 2075 проб крови и проведения 19195 исследований, применения методов доказательной медицины. Исследовали 642 полученных гемокультур от больных, представили характеристики 140 полимикробных гемокультур, оценили количественную и видовую характеристики ассоциантов полимикробности.

Работа проведена с помощью современных микроскопических, бактериологических, масс-спектрометрических, молекулярно-генетических и клинико-лабораторных методов исследования с использованием сертифицированного и поверенного оборудо-

вания, программного обеспечения для биоинформатического и статистического анализов полученных данных.

Работа выполнена в соответствии с отраслевой научно-исследовательской программой «Проблемно–ориентированные научные исследования в отрасли эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями на 2016-2020 гг.» в рамках НИР ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора: «Изучение роли микробиоценозов ротоглотки и крови при дифтерии, коклюше и других инфекционно-воспалительных заболеваний» (Рег. № АААА-А16-116021550311-2).

Диссертация апробирована на заседании Ученого Совета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол № 1 от 17 июня 2021 г.).

Материалы диссертационной работы были доложены на: 7<sup>th</sup> ESCMID (Vienna, Austria, 1995); 2<sup>nd</sup> World Congress on Anaerobic Bacteria and Infections (Nice, France, 1998), 10<sup>th</sup> ESCMID (Stockholm, Sweden, 2000); 8-м съезде «Проблемы инфекции в клинической медицине» (Санкт-Петербург, 2002); 2<sup>nd</sup> ICCAID (Almaty, Kazakhstan, 2008); 23<sup>rd</sup> ESCMID (Berlin, Germany, 2013); конференции «Микробиология: от микроскопа до нанотехнологий» (Санкт-Петербург, 2013); 24<sup>th</sup> ESCMID (Barcelona, Spain, 2014); III микологическом форуме (Москва, 2015); II Национальном конгрессе бактериологов (Москва, 2016); IV съезде микологов (Москва, 2017); III Национальном конгрессе бактериологов (Москва, 2017); XXIV Кашкинские чтения, конгрессе по медицинской микологии и иммунологии (Санкт-Петербург, 2021); VI Национальном конгрессе бактериологов (Казань, 2021).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 38 научных работ, включая 16 статей в рецензируемых журналах, 3 статьи – в других изданиях, 4 тезисов – в рецензируемых изданиях, 15 – тезисов в материалах конференций. Получено 5 патентов на изобретения РФ. Подготовлено 5 методических рекомендаций, 2 рационализаторских предложения.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 280 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и 2 приложений. В список литературы из 373 работ включены 110 отечественных и 263 зарубежных публикаций. Диссертация содержит 93 таблицы, иллюстрирована 36 рисунками.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Современные пути повышения информативности микробиологической диагностики инфекции кровотока**

#### ***Пробоподготовка и скрининг в процессе получения гемокультуры***

В последнем руководстве по диагностической микробиологии («Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology», 7 ed., 2017) расписаны позиции для отбора биоматериала, включая кровь. В международных европейских рекомендациях по взятию венозной крови «GP41-А6, 2018 г.» рекомендуется в XXI веке применять малый объем пробы крови, одну пробу для всех видов анализов, оптимизировать процесс и менеджмент качества исследования.

#### ***Количество проб и объем крови для инокуляции***

У госпитальных больных 10 мл крови вносили во флакон с 200 мл жидкой сердечно-мозговой среды, закрытый резиновой пробкой и завальцованный металлическим колпач-

ком, соблюдали соотношение крови к среде 1:20 и заправляли инертным газом для создания анаэробных условий. Отбирали парные пробы крови с интервалом 30 мин, иногда количество проб доходило до 16. У госпитальных больных с подозрением на ИК (325) исследовали 810 проб крови, на одного больного приходилось 2,5 пробы крови.

У внегоспитальных больных отбирали венозную кровь в количестве 4,5 мл в закрытую вакуумную систему промышленного производства для крови с содержанием 0,5 мл цитрата натрия, система предусматривает выполнение исследований в течение 4-х часов с момента взятия крови. Мембрана в крышке системы препятствует прямому контакту с местом взятия крови и защищает от контаминации пробу крови. Кровь набирали поршнем шприца до упора, затем шприц удаляли из вены, иглу снимали, отламывали поршень, систему в виде пробирки доставляли в лабораторию. После центрифугирования 1000 об/мин в течение 15–20 мин верхний светлый слой плазмы удаляли стерильной пипеткой, лейкоцитарный слой в виде тонкой белой полоски лежал на эритроцитах. Капли слоя наносили на высокопитательные кровяные агары в чашках Петри, распределяли петлей по поверхности среды, культивировали в аэробных и анаэробных условиях. У внегоспитальных больных с подозрением на ИК (183) исследовали 250 проб крови, т.е. на одного пациента приходилось 1,4 пробы крови.

При взятии одной пробы крови получали гемокультуры в 100% случаев у госпитальных и внегоспитальных больных, при парном взятии крови получали гемокультуру в 64,3% случаев, при 5 пробах крови – в 45,0%, при 7 пробах – в 50,0%, при 16 пробах – в 37,5% случаев. При увеличении количества проб крови наблюдали эффект снижения получения гемокультур у госпитальных до 9,1% и у внегоспитальных до 40,0% случаев. При исследовании 287 парных проб крови в одном флаконе получали гемокультуру в 55,4% и в двух – в 25,4% случаев и чаще рост микроорганизмов отмечали в первом флаконе, чем во втором (58,2% и 42,8% соответственно).

Таким образом, у госпитальных больных при использовании парных флаконов и 2,5 пробы крови на 1 больного получали гемокультуру в 38,3% случаев, у внегоспитальных пациентов отбирали чаще одну пробу крови (73,2%), чем две (20,3%) и рост микроорганизмов получали в 48,0% случаев при 1,4 пробы крови на 1 пациента. Увеличение количества проб крови не решало вопрос повышения эффективности получения гемокультур у больных.

#### Скрининг гемокультур

Сравнили результаты выделения микроорганизмов из 1594 проб крови при исследовании классическим методом (посев 10 мл цельной крови во флакон) и из 481 пробы крови – экспресс-методом (прямой посев лейкоцитарного слоя). Оказалось, что при классическом методе получили положительный результат в 27,4%, а при экспресс-методе – в 42,8% случаев, т.е. прямой посев лейкоцитарного слоя пробы крови был в 1,6 раза эффективнее классического ( $p < 0,001$ ), учитывая то, что отбирали в 2,2 раза меньше объем крови, чем для классического (4,5 мл и 10,0 мл соответственно) и количество проб меньше классического в 1,8 раза.

Оценили выделение микроорганизмов при параллельном посеве цельной крови (классический метод) и лейкоцитарного слоя (экспресс-метод) на 31 пробе крови больных. Гемокультуры получили в 38,7% классическим методом и в 96,8% – экспресс-методом ( $\chi^2=29,31$ ;  $p < 0,001$ ). Эффективность превышала в 2,5 раза.

Таким образом, экспресс-метод получения гемокультуры (прямой посев лейкоцитарного слоя пробы крови на высокопитательный агар) показал эффективность выделения гемокультур в 1,6 раза выше классического метода гемокультивирования при условии взятия в 2,2 раза меньше объема крови и в 1,8 раза меньше количества проб крови. Парал-

тельное исследование крови показало превышение эффективности получения гемокультур экспресс-методом в 2,5 раза. Другое достоинство экспресс-метода в получении гемокультур заключается в возможности использования MALDI ToF-MS для идентификации выросших колоний на следующий день от момента поступления крови в лабораторию, т.е. получение ответа на второй день. На разработанный метод получен патент на изобретение РФ № RU 2098486 С 1 от 10.12.1997 г.

### **Оптимизация условий процесса инкубирования исследуемых проб крови**

Согласно Приказу № 535 от 1985 г. инкубирование посевов крови проводится от 5 до 7 суток. Мы выдерживали флаконы в термостате с инокулированной кровью до 10 дней и более. Всего получили 438 положительных гемокультур, из которых 238 (54,3%) выросло в течение 7 дней и дополнительно 200 (45,7%) в период более 7 дней инкубации. Визуально из 200 флаконов большинство были без видимого роста (59,5%) и меньше с признаками роста (40,5%) (Рисунок 1).

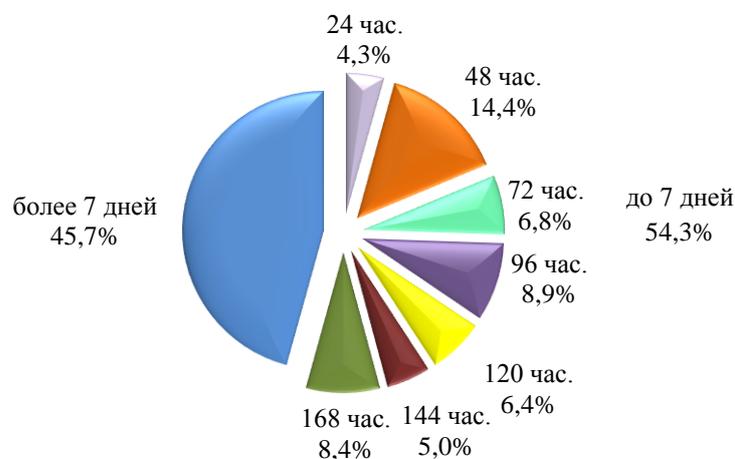


Рисунок 1 – Время получения гемокультур при ручном гемокультивировании

Контрольные высевы выполняли из всех флаконов с культивированием в аэробных и анаэробных условиях. Из 200 флаконов выделили 239 штаммов микроорганизмов, из которых 33,5% относились к клинически значимым возбудителям ИК. Дополнительно получили 214 аэробных (89,5%), 23 анаэробных (9,6%) бактерий и 2 (0,9%) штамма *Candida spp.*. Анаэробные условия субкультивирования повысили диагностическую эффективность ИК на 41,0%. Среди аэробов лидировали грамположительные бактерии (87,4%) с преобладанием стафилококков (63,6%), среди грамотрицательных – представители сем. *Enterobacteriaceae* (66,7%). Дополнительные гемокультуры характеризовались полимикробным составом в 16,0% случаев.

Таким образом, по данным зарубежных источников при гемокультивировании в автоматизированных системах субкультивирование визуально отрицательных проб после 7 дней инкубации давало рост микроорганизмов в 0,2% случаев, в нашем варианте – в 45,7% случаях с выделением дополнительно 239 клинически значимых штаммов микроорганизмов при использовании анаэробных условий субкультивирования.

### **Вариативное культивирование проб крови**

Выделенные из крови 816 штаммов возбудителей состояли из факультативно-анаэробных (695) и облигатно-анаэробных микроорганизмов (121), которые были получены при разных газовых условиях (Таблица 2).

Таблица 2 – Выделение возбудителей из крови при разных газовых условиях культивирования, n (%)

Газовые условия	Штаммы микроорганизмов					
	Всего (n=816)		Госпитальные (n=519)		Внегоспитальные (n=297)	
	Факультативно-анаэробные (n=695)	Строгие анаэробные (n=121)	Факультативно-анаэробные (n=470)	Строгие анаэробные (n=49)	Факультативно-анаэробные (n=225)	Строгие анаэробные (n=72)
Аэробные	218 (31,4)	0	159 (33,8)	0	59 (26,2)	0
Анаэробные	293 (42,2)	121 (100,0)	158 (33,6)	49 (100,0)	135 (60,0)	72 (100,0)
Аэробные и анаэробные	184 (26,5)	0	153 (32,6)	0	31 (13,8)	0

Факультативные анаэробы давали рост в 31,4% случаев в аэробных условиях и в 42,2% – в анаэробных, которые позволили дополнительно выделить 293 аэробных возбудителей и, таким образом, увеличить диагностическую эффективность на 42,2%, включая на 33,6% при госпитальной инфекции кровотока (ГИК) и на 60,0% – внегоспитальной инфекции кровотока (ВГИК).

При субкультивировании материала «кровь-среда» (425 проб) получили рост факультативно-анаэробных микроорганизмов в аэробных (7,3%), микроаэрофильных (20,9%) и анаэробных (32,5%) условиях инкубирования (Рисунок 2). При использовании только аэробных условий культивирования диагностическая эффективность снизилась бы на 32,5%.

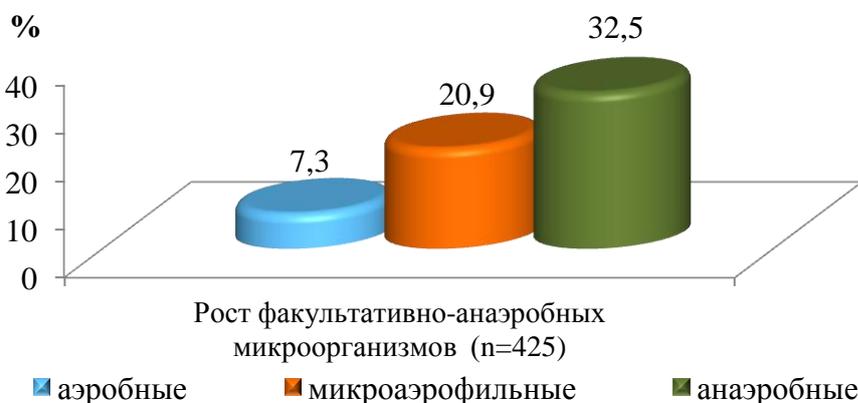


Рисунок 2 – Влияние газовых условий на рост факультативно-анаэробных микроорганизмов

Таким образом, анаэробные условия при гемокультивировании повысили эффективность роста ведущих факультативно-анаэробных возбудителей ИК на 42,2% и при субкультивировании материала «кровь-среда» – на 32,5%. При ИК анаэробные условия необходимы для жизнедеятельности микроорганизмов в искусственных условиях существования.

### ***Нутриативные особенности микроорганизмов из числа вероятных участников бактериемий***

В России панкреатический гидролизат рыбной муки является основой питательных сред промышленного отечественного производства, сердечно-мозговые среды промышленным способом не выпускаются.

Нами разработаны рецептуры и лабораторно изготовлены сердечно-мозговая среда (СМС) и сердечно-мозговой агар (СМА) на основе сердечно-мозгового экстракта.

Среды контролировали по физико-химическим параметрам, на чувствительность и скорость роста микроорганизмов, оценивали по культуральным, морфологическим и биохимическим признакам.

#### Приготовление сердечно-мозгового экстракта

Свежие сердца и мозги крупного рогатого скота очищали от пленок, сосудов, измельчали, заливали одинарным количеством водопроводной воды, оставляли на ночь в холодильнике при +4<sup>0</sup>С. На следующий день настои кипятили 5–10 мин, фильтровали, разливали по флаконам, закрывали резиновыми пробками, обкатывали металлическими колпачками, автоклавировали 15 мин при 0,7 атмосферы и хранили в условиях холодильника при +4<sup>0</sup> С.

#### Приготовление жидкой сердечно-мозговой среды

Сухие ингредиенты среды растворяли в дистиллированной воде, кипятили 2–3 мин, добавляли стерильные мозговой и сердечный экстракты, раствор гемина и менадиона, доводили рН до 7,4–7,6 раствором 8 N NaOH, разливали по флаконам, закрывали резиновыми пробками, насыщали флаконы чистым азотом, обкатывали флаконы металлическими колпачками, автоклавировали при 1 атмосфере в течение 15–20 мин и хранили при +4<sup>0</sup>С (Таблица 3).

Таблица 3 – Состав жидкой сердечно-мозговой среды

Компоненты	Содержание
Мозговой экстракт	100 мл/л
Сердечный экстракт	150 мл/л
Ферментативный гидролизат казеина	15 г/л
Дрожжевой экстракт	5 г/л
Натрия хлорид	2,5 г/л
Глюкоза	5 г/л
Натрия тиогликолят	0,5 г/л
L-цистеина гидрохлорид	0,75 г/л
1% р-р гемина	1,0 мл/л
1% р-р менадиона	1,0 мл/л
Твин-80	1,0 мл/л
Агар-агар	0,75 г/л
Дистиллированная вода	до 1 литра
рН=7,4–7,6 Насыщение среды чистым азотом для создания анаэробных условий.	

#### Приготовление сердечно-мозгового агара

Для 1-го состава приготовления СМА в 50,0 мл дистиллированной воды растворяли L-глутамин, аденин, парааминобензойную кислоту, L-цистеин, никотинамид, солянокислый цистеин, азотнокислый калий. Для 2-го состава в 500 мл дистиллированной воды растворяли агар микробиологический, пептон, глюкозу, хлористый натрий, двухзамещенный фосфорнокислый натрий, кипятили в течение 5–10 мин, в горячую смесь вносили содержимое 1-го состава, мозговой и сердечный экстракты, гемин и доводили дистиллированной водой до объема в 1000 мл и рН до 7,4–7,6 раствором 8 N NaOH, разливали по 300 мл во флаконы, закрывали резиновыми пробками, обкатывали алюминиевыми колпачками, автоклавировали при 0,5–0,6 атм в течение 20 минут и хранили в условиях холодильника. Для приготовления чашек Петри расплавляли агар, остужали, добавляли менадион и гемолизированную кровь (на 100 мл агара 5–7 мл крови), разливали по чашкам Петри слоем до 5 мм (ГОСТ 23932–90 Е).

#### Контроль и апробация сердечно-мозговых сред

Чувствительность жидкой СМС оценивали полуколичественным способом на коллекционных и свежeweделенных штаммах микроорганизмов и сравнивали со «сре-

дой для контроля стерильности» (СКС), приготовленной по прописи Приказа № 535 от 1985 г. Посевной инокулят испытуемых штаммов составлял 10–100 КОЕ/мл. Оценку чувствительности среды определяли по рекомендациям ГОСТ Р ЕН 12322–2010, т. е. по мутности среды. СМС обладал более высокой чувствительностью по сравнению со средой СКС, на которой стафилококки давали слабый рост в виде незначительной мутности при концентрации в 10 КОЕ/мл, другие испытуемые штаммы не давали роста при культивировании при +37° С в течение 18–20 часов. Аналогичные результаты получены для посевной концентрации в 100 КОЕ/мл.

Ростовые свойства СМС сравнивали со средой СКС на 260 пробах периферической крови терапевтических больных. В 100 мл СКС и СМС вносили по 10,0 мл крови, флаконы с СКС закрывали ватно-марлевыми пробками, флаконы с СМС насыщали чистым азотом, закрывали резиновыми пробками, обкатывали алюминиевыми колпачками. Общий рост микроорганизмов был получен в 3 раза чаще на СМС, чем на СКС (40,6% и 13,5% соответственно), включая микроорганизмы: аэробные (22,7% и 9,6% соответственно;  $\chi^2=16,41$ ;  $p < 0,001$ ), микроаэрофильные (12,0% и 3,8% соответственно;  $\chi^2=11,68$ ;  $p < 0,001$ ) и анаэробные (6,2% и 0% соответственно;  $\chi^2=14,51$ ;  $p < 0,001$ ) (Рисунок 3).

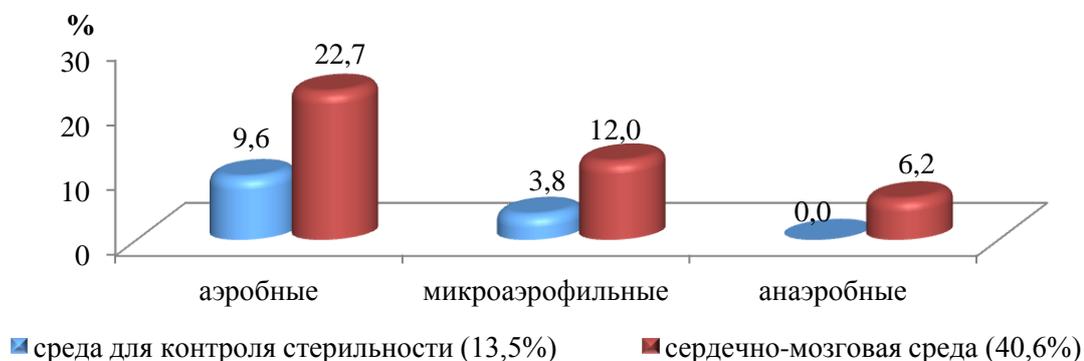


Рисунок 3 – Частота выделения микроорганизмов из крови на средах: СКС и жидкая СМС

Изучена эффективность роста моно- и полимикробных гемокультур на средах: сахарный бульон, СКС и СМС (Рисунок 4). Рост мономикробных гемокультур в 13,4 раза был активнее на СМС, чем на сахарном бульоне ( $\chi^2=34,88$ ;  $p < 0,001$ ) и в 2,3 раза – чем на СКС ( $\chi^2=25,24$ ;  $p < 0,001$ ). Полимикробные гемокультуры в 4,3 раза чаще получали на СМС, чем на СКС (7,3% и 1,7% соответственно,  $\chi^2=7,33$ ;  $p=0,0068$ ). На разработанную питательную среду получен патент на изобретение РФ № RU 2 650 863 С 1 от 13.02.2017 г.

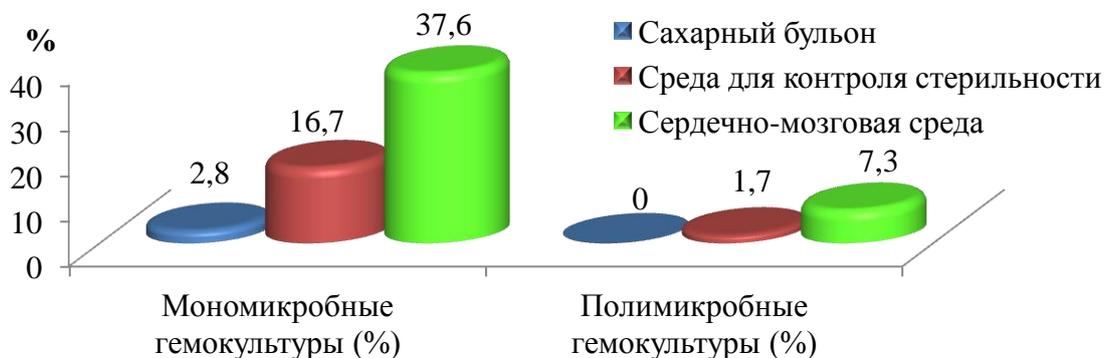


Рисунок 4 – Результаты получения мономикробных и полимикробных гемокультур на средах: сахарный бульон, СКС и жидкая СМС

Ростовые свойства СМА протестированы на 5% кровяном МПА и СМА при посеве 300 проб материала «кровь-среда» при разных газовых условиях культивирования. Общий рост микроорганизмов в аэробных условиях был результативнее в 2 раза на СМА, чем на 5% МПА (35,7% и 17,3% соответственно). Аэробные микроорганизмы в 2 раза чаще давали рост на СМА, чем на 5% МПА ( $\chi^2=18,77$ ;  $p < 0,001$ ), микроаэрофильные – в 3,6 раза ( $\chi^2=5,73$ ;  $p=0,017$ ) (Рисунок 5).

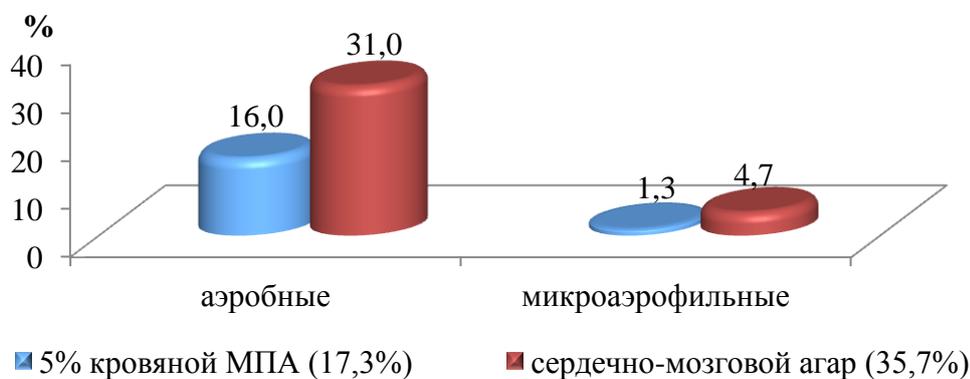


Рисунок 5 – Рост микроорганизмов при субкультивировании материала «кровь-среда» на 5% МПА и СМА в аэробных газовых условиях

Рост микроорганизмов в анаэробных условиях был активнее в 2,2 раза на СМА, чем на 5% МПА (50,3% и 22,6% соответственно) (Рисунок 6).

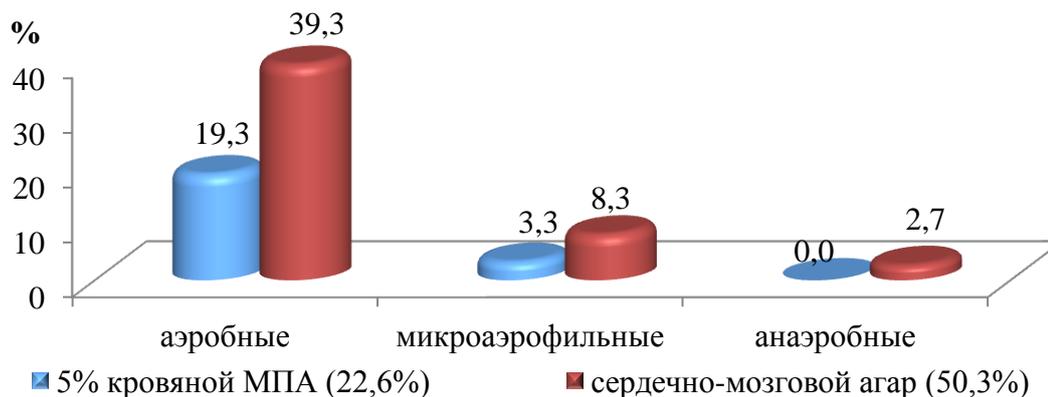


Рисунок 6 – Рост микроорганизмов при субкультивировании материала «кровь-среда» на 5% МПА и СМА в анаэробных газовых условиях

Рост аэробных микроорганизмов был продуктивнее в 2 раза на СМА, чем на 5% МПА ( $\chi^2=28,95$ ;  $p < 0,001$ ), микроаэрофильных – в 2,5 раза ( $\chi^2=6,83$ ;  $p=0,009$ ) и анаэробных – в 3 раза ( $\chi^2=6,21$ ;  $p=0,12$ ). На разработанный сердечно-мозговой агар получен патент на изобретение РФ № RU 2 660 708 С 1 от 29.09.2017 г.

Таким образом, при культивировании крови общий рост микроорганизмов был получен в 3 раза чаще на СМС, чем на СКС. Мономикробные гемокультуры в 13,4 раза чаще были положительными на СМС, чем на сахарном бульоне и в 2,3 раза – чем на СКС. Полимикробные гемокультуры в 4,3 раза чаще получали на СМС, чем на СКС. При субкультивировании материала «кровь-среда» общий рост микроорганизмов в аэробных условиях был результативнее в 2 раза на СМА, чем на 5% МПА и в анаэробных условиях – в 2,2 раза. Разработанные СМС и СМА апробированы с целью возможного их промышленного выпуска, так как техническое решение сред соответствует критерию «промышленной применимости» и позволяет расширить список питательных сред промышленного производства в России.

### *Пути повышения информативности методом визуализации микроорганизмов в диагностическом материале*

Визуализация микроорганизмов в крови представляет собой микроскопическое исследование мазка крови и информацию о циркулирующих микроорганизмах в пределах один–два часа с момента поступления материала в лабораторию.

Применяли «капельный» метод согласно Приказу №535, «пробирочный» метод приготовления в лаборатории центрифужных пробирок с 0,5 мл 5% лимонно-кислого натрия с добавлением 4,5 мл цельной крови; метод «шприц-пробирок» с использованием вакуумных шприцов промышленного производства с цитратом натрия и трансформацией в пробирку после взятия 4,5 мл крови. После центрифугирования при режиме 1000 об/мин в течение 15–20 минут пипеткой удаляли плазму и капли лейкоцитарного слоя наносили на предметные стекла, делали мазок техникой «двух стекол», высушивали, фиксировали, окрашивали по Граму.

В исследование было включено 1287 мазков проб крови. «Капельная» техника приготовления мазков показала самую низкую степень обнаружения микроорганизмов в крови по сравнению с «пробирочным» и методом «шприц-пробирок» (52,6%, 65,6% и 98,2% соответственно;  $\chi^2=282,4$ ;  $p < 0,001$ ). При сравнении совпадения результатов микроскопии с бактериологическими оказалось, что при положительной гемокультуре микроорганизмы обнаруживали в мазках крови в 2,2 раза чаще, чем не находили (69,2% и 30,8% соответственно;  $p < 0,001$ ). Сравнили операционные характеристики методов приготовления мазов крови (Таблица 4).

Таблица 4 – Операционные характеристики техник приготовления мазков крови (%)

Характеристики	«Капельный»	«Пробирочный»	«Шприц-пробирка»	Общее
Чувствительность	54,4	66,5	100,0	69,2
Специфичность	43,4	29,7	16,0	30,1
Точность	45,8	40,2	54,5	43,8
ППР (+)	36,4	27,5	54,1	34,7
ППР (-)	56,7	68,8	100,0	64,5

Более высокий положительный прогноз (54,1%) и наибольшую степень чувствительности (100,0%) показал метод приготовления мазка при помощи «шприц–пробирки» по отношению к «пробирочному» (66,5%) и «капельному» (54,4%) методам.

При окрашивании мазков крови по Граму эритроцитарный красный фон мазка затрудняет обнаружение грамотрицательных бактерий, поэтому разработали метод «осветления» мазка путем гемолиза эритроцитов, который происходит при контакте с водой. Покрывали площадь мазка дистиллированной водой на 2–5 секунд, сливали воду, мазок приобретал вид «светлого» стекла, высушивали, фиксировали над пламенем горелки и окрашивали по Граму, микроскопировали с иммерсией и увеличением  $\times 1000$  (МИКРОМЕД-1, ЛОМО, Россия (иммерсионный объектив МИ 90–1,25 и окуляр К 7). При контрольной микроскопии 20 мазков крови с грамотрицательными бактериями последние на фоне гемолизированных эритроцитов выявлялись чаще, чем без гемолиза (94,3% и 11,4% соответственно;  $p < 0,001$ ). На разработанный метод получен патент на изобретение № RU 2 616 249 С 1 от 20.01.2016 г.

Таким образом, метод приготовления мазка при помощи «шприц–пробирки» показал самый высокий положительный прогноз (54,1%) и наибольшую степень чувствительности (100,0%) для микроскопического исследования крови. Метод «осветления» мазка путем гемолиза эритроцитов позволяет выявлять грамотрицательные бактерии чаще, чем без гемолиза эритроцитов.

### ***Современные молекулярно-генетические методы в структуре комплексной диагностики инфекций кровотока***

Для индикации и идентификации микроорганизмов в крови нами применено несколько подходов: 1) метод *16S rRNA* типирования; 2) оптимизированная методика ПЦР для индикации и идентификации Грам+ / Грам- микроорганизмов с чистой культуры выросших микроорганизмов; 3) разработанная методика nested-ПЦР для индикации ДНК микроорганизмов из лейкоцитарного слоя крови; 4) разработанная методика nested-ПЦР для идентификации Грам+ / Грам- микроорганизмов из лейкоцитарного слоя крови; 5) полногеномное секвенирование.

Оптимизация методики проведения метода ПЦР для индикации и идентификации Грам+ / Грам- микроорганизмов была проведена в два этапа. ДНК из выросших на 10% кровяном агаре колоний микроорганизмов выделяли методом кипячения и осуществляли индикацию ДНК микроорганизмов по выявлению фрагмента гена *16S rRNA*. Наличие положительного сигнала свидетельствовало о наличии в пробе ДНК микроорганизмов. Далее проводили следующий этап с целью выявления ДНК Грам+ / Грам- микроорганизмов с помощью праймеров (Greisen, K., 1994; Klausegger, A., 1999) (Рисунок 7 А, Б).

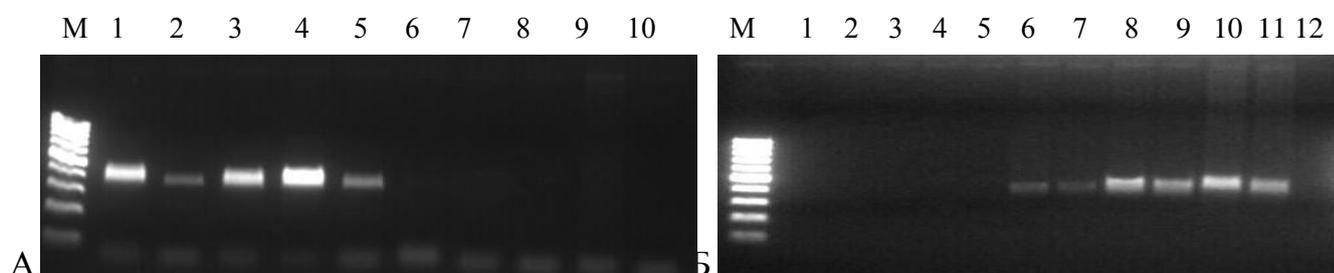


Рисунок 7 – Электрофореграмма результатов амплификации оптимизированной методики ПЦР для идентификации: А. Грам+ микроорганизмов (с праймерами DG74F - 143R); Б. Грам- микроорганизмов (с праймерами DG74F - 68dR)

Примечание: А. М – маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1-5 - ДНК Грам+ микроорганизмов; 6-10 - ДНК Грам- микроорганизмов; Б. М – маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1-5 - ДНК Грам+ микроорганизмов; 6-10 – ДНК Грам- микроорганизмов; 11 - положительный контроль (ДНК штамма *B.pertussis*); 10 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

Оценку аналитической специфичности оптимизированной методики ПЦР осуществляли с использованием коллекционных и диких штаммов микроорганизмов. Проведенные исследования показали, что с праймерами DG74F-143R во всех образцах ДНК типовых штаммов Грам+ микроорганизмов получены положительные сигналы и во всех образцах ДНК типовых штаммов Грам- микроорганизмов - отрицательный результат, и наоборот, с праймерами DG74F-68dR во всех образцах ДНК типовых штаммов Грам+ микроорганизмов получены отрицательные результаты и во всех образцах ДНК типовых штаммов Грам- микроорганизмов - положительные сигналы. В результате исследования перекрестных реакций, свидетельствующих об амплификации посторонней мишени, не выявлено.

### ***Разработка nested-ПЦР для индикации и идентификации микроорганизмов в лейкоцитарном слое проб крови***

Для повышения чувствительности определения ДНК бактерий применяли методику nested-ПЦР с двумя парами праймеров, которые предварительно были сконструированы с помощью BLAST на основании анализа нуклеотидных последовательностей референсных штаммов (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В качестве клинических образцов исполь-

зован лейкоцитарный слой пробы крови.

Первый раунд nested-ПЦР для индикации микроорганизмов из лейкоцитарного слоя проводили с помощью наружных праймеров на фрагмент гена *16S rRNA*, что позволило выявить ДНК микроорганизмов в концентрации  $10^4$ – $10^5$  степени. Второй раунд nested-ПЦР для индикации ДНК микроорганизмов в лейкоцитарном слое проводили с помощью внутренних праймеров DG74F-65abR (Greisen, K., 1994; Klausegger, A., 1999), что позволило выявить ДНК в концентрации  $10^3$  степени (Рисунок 8 А, Б).

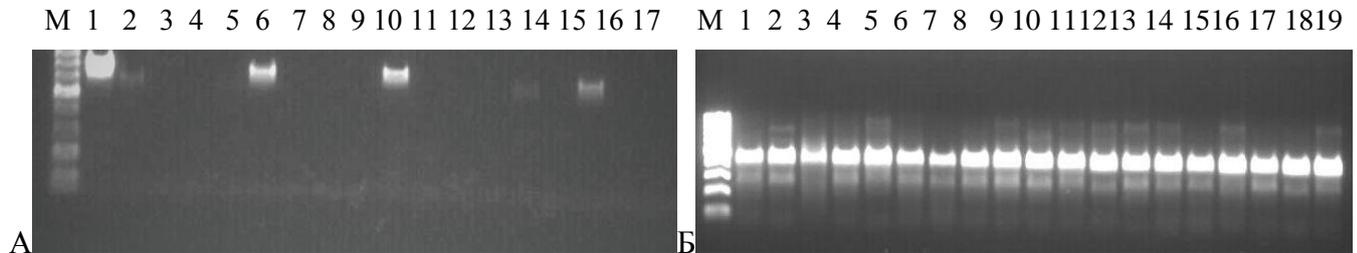


Рисунок 8 – Результаты постановки nested-ПЦР для индикации ДНК микроорганизмов из лейкоцитарного слоя (первый (А) и второй (Б) раунды)

Примечание: А. М – маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1, 2, 6, 10, 14 – ДНК микроорганизмов; 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15 – отрицательный результат; 16 – положительный контроль (ДНК штамма *B.pertussis*); 17 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь). Б. М – маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1–18 – ДНК микроорганизмов; 19 – положительный контроль (ДНК штамма *B.pertussis*)

Следующий этап в диагностике микроорганизмов в лейкоцитарном слое расширен за счет определения Грам-принадлежности микроорганизмов (Рисунок 9 А, Б). Для идентификации Грам+ микроорганизмов из лейкоцитарного слоя второй раунд nested-ПЦР проводили с помощью внутренних праймеров DG74F-143R (Greisen, K., 1994; Klausegger A., 1999). Положительные результаты, полученные во втором раунде nested-ПЦР, свидетельствуют о наличии в пробах лейкоцитарного слоя крови ДНК Грам+ микроорганизмов. Для идентификации Грам– микроорганизмов второй раунд проводили с помощью внутренних праймеров DG74F-68dR (Greisen, K., 1994; Klausegger, 1999).

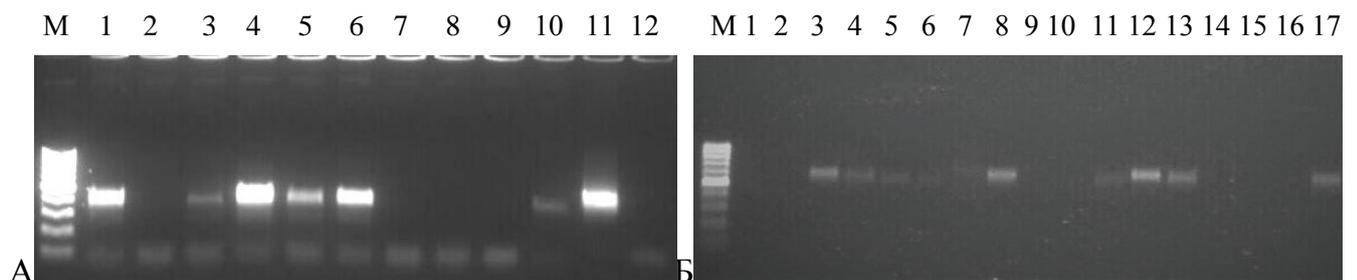


Рисунок 9 – Результаты постановки nested-ПЦР из лейкоцитарного слоя крови для идентификации ДНК Грам+ микроорганизмов с праймерами DG74F-143R (второй раунд) (А) и Грам- микроорганизмов с праймерами DG74F-68dR (второй раунд)

Примечание: А. М - маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1, 3, 4, 5, 6, 10 - ДНК Грам+ микроорганизмов; 2, 7, 8, 9 - отрицательные образцы; 11 - положительный контроль (ДНК штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665), 12 - отрицательный контроль (ПЦР-смесь). Б. М - маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1, 2, 9, 10, 14, 15 - отрицательные образцы; 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13 - ДНК Грам- микроорганизмов; 16 - отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 17 - положительный контроль (ДНК штамма *B. pertussis*)

Положительные результаты, полученные во втором раунде nested-ПЦР, свидетельствуют о наличии в пробах лейкоцитарного слоя крови ДНК Грам– микроорганизмов. Итак, первый раунд постановки nested-ПЦР позволял выявлять ДНК микроорганизмов в концентрации  $10^4$ – $10^5$  степени. Проведение второго раунда nested-ПЦР со специфическими праймерами на Грам+ / Грам– микроорганизмы позволял выявить ДНК в концентрации  $10^3$ – $10^4$  степени непосредственно из лейкоцитарного слоя.

Апробация разработанной методики nested-ПЦР для идентификации ДНК Грам+ / Грам– микроорганизмов проведена на 26 пробах крови (лейкоцитарный слой), из которых 25 оказались положительными (96,2%) и содержали ДНК микроорганизмов. В первом раунде положительный результат был получен в одном образце, во втором раунде – в 25 пробах, что свидетельствовало о наличии ДНК микроорганизмов в концентрации  $10^3$  степени, из которых в 7 случаях идентифицировали ДНК Грам+ микроорганизмов, в 9 случаях – ДНК Грам– микроорганизмов и в 9 случаях – комплекс ДНК Грам+ и Грам– микроорганизмов. Результаты параллельных исследований лейкоцитарного слоя методами микроскопии и ПЦР совпали в 100,0% случаев.

### **Полногеномное секвенирование штамма *Aerococcus* spp. 1KP-2016**

Нами была выделена культура микроорганизма из лейкоцитарного слоя крови пациента с субфебрилитетом. На колумбийском агаре через 24–48 часов формировались мелкие, гладкие колонии с неровными краями, приподнятым центром, полупрозрачные серовато-белого цвета с небольшой зоной гемолиза (Рисунок 10 А). В мазке были грамположительные кокки, образующие тетрады (Рисунок 10 Б).

С целью идентификации нами проведено полногеномное секвенирование генома штамма *Aerococcus* spp. 1KP-2016 с помощью системы Ion Proton system. Сборка генома *De novo* была сделана с помощью программного обеспечения SPAdes. Для определения филогенетических взаимоотношений штамма *Aerococcus* spp. 1KP-2016 выполнена реконструкция филогении с использованием подходов на основе *16S rRNA* и опубликованных геномов близкородственных представителей рода *Aerococcus* и *Abiotrophia defectiva* ATCC 49176.

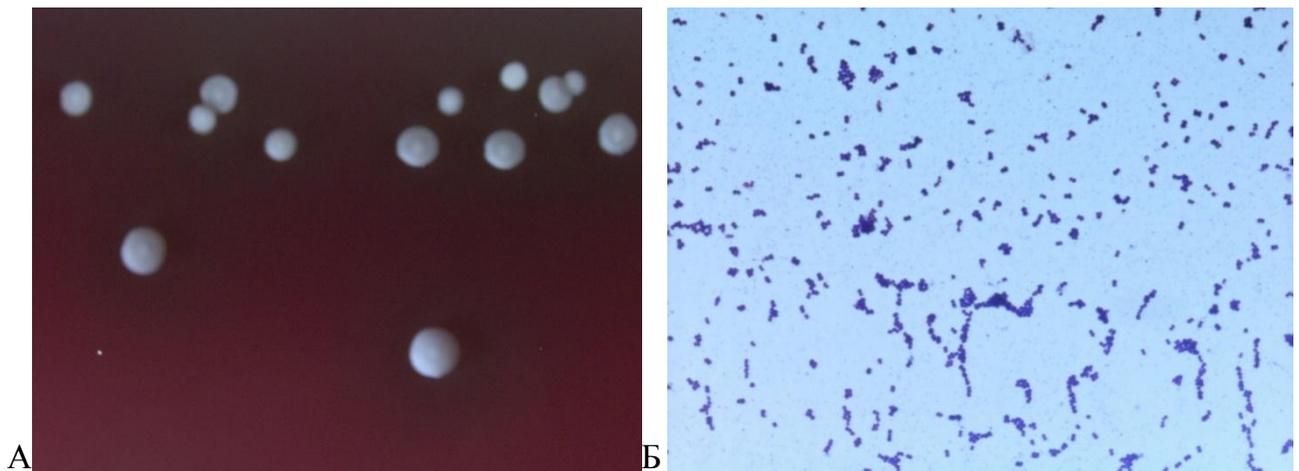


Рисунок 10 - Колонии и микроскопия мазка штамма *Aerococcus* spp. 1KP-2016

Примечание: А. рост на Columbia Agar Base (Conda, Испания) (Stereo Discovery, V12, Carl Zeiss Microscopy, GmbH; диапазон увеличений –  $8\times$  –  $100\times$ ); Б. мазок по Граму (световой микроскоп Axio Scope A1 (объектив EC Plan-NEOFLUAR  $100\times 1,3$ ; окуляр PI  $10\times 23$  Br foc (Carl Zeiss, Германия))

Нуклеотидные последовательности *16S rRNA* выровнены с помощью MUSCLE и конкатенированы. Реконструкция филогении осуществлялась по алгоритму Maximum Likelihood, реализованного в программном обеспечении *raxML*, с использованием модели

GTR+CAT (<http://www.ch.embnet.org/raxml-bb/>). Белок-кодирующие области в геномах в соответствии с аннотациями, представленными в базах данных, были кластеризованы в группы ортологов с применением программного обеспечения OrthoMCL и со стандартными настройками. В результате был получен коровый протеом из 543 консервативных белковых групп ортологов, входящие в которые гены присутствовали в геноме в одной копии. Аминокислотные последовательности были выровнены с помощью MUSCLE и конкатенированы. Филогенетическая реконструкция выполнена с помощью программного обеспечения RapidNJ. Средняя нуклеотидная идентичность между геномами была рассчитана с помощью подхода ANIb с помощью онлайн-сервиса JspeciesWS.

Драфтовый геном штамма *Aerococcus* spp. 1KP-2016 депонирован в DBJ/EMBL/GenBank под номером NEEY0000000. В результате сборки получено 119 контигов, общая длина геномной последовательности составляла 2042438 п.н. и GC-состав равен 38,5%. Последовательность *16S rRNA* штамма *Aerococcus* spp. 1KP-2016 на 98,6–98,7% идентична последовательностям *Aerococcus group viridans* и *A. urinaeequi* (Рисунок 11). Эти значения близки к порогу дифференциации бактериальных видов. Нуклеотидная идентичность является общепринятым критерием различия видов и между описанным геномом и общедоступными геномами *A. group viridans* и *A. urinaeequi* значительно меньше, чем 96% (Таблица 5), что явно отделяет *Aerococcus* spp. 1KP-2016 от этих видов.

Реконструкция филогении, основанная как на генах *16S rRNA*, так и на генах, кодирующих белок, позиционирует *Aerococcus* spp. 1KP-2016 как вид, который близко связан, но отличается от клада *A. group viridans* и *A. urinaeequi*, и представляет собой новый вид рода *Aerococcus*. Штамм *Aerococcus* spp. 1KP-2016 депонирован в «ГКПМ-ОБОЛЕНСК» (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора).

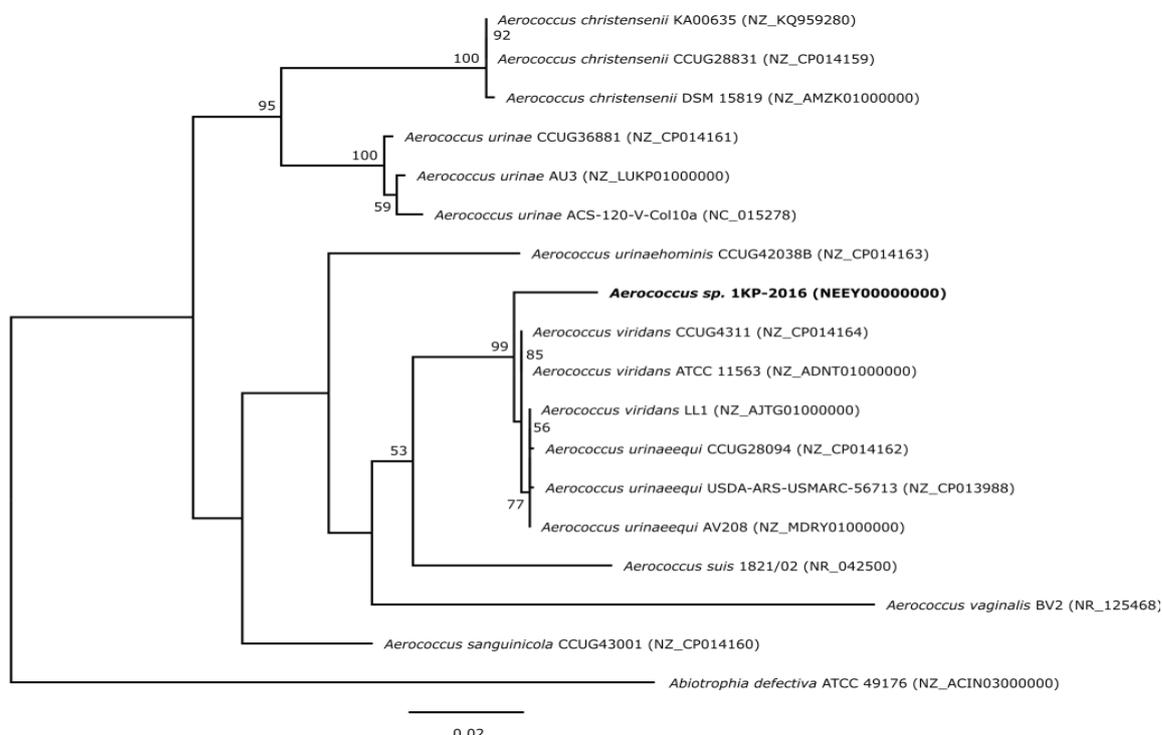


Рисунок 11 – Филогенетическое дерево последовательностей генов *16S rRNA*

Примечание: планка шкалы представляет 0,02 замены на нуклеотидную позицию. Номер в базе данных Genbank дается рядом с именем штамма. Цифры в узлах дерева определяют уровень поддержки, полученный с помощью метода rapid bootstrap. Помечены только узлы с уровнями загрузки выше 50%

Таблица 5 – Средняя идентичность генома между *Aerococcus* spp. 1KP-2016 и наиболее похожими опубликованными геномами

Виды <i>Aerococcus</i>	<i>A. spp.</i> 1KP-2016	<i>A. viridans</i> LL1	<i>A. viridans</i> ATCC 11563	<i>A. viridans</i> CCUG4311	<i>A. urinaeequi</i> DSM 20341	<i>A. urinaeequi</i> CCUG28094	<i>A. urinaeequi</i> USDA- ARS-USMARC-56713	<i>A. urinaeequi</i> AV208
<i>A. spp.</i> 1KP-2016	*	76.47	77.53	77.87	76.26	76.30	76.17	77.44
<i>A. viridans</i> LL1	76.43	*	93.81	93.83	95.24	95.24	95.05	96.20
<i>A. viridans</i> ATCC 11563	77.38	93.76	*	100.00	92.78	92.78	92.63	94.37
<i>A. viridans</i> CCUG4311	79.02	93.65	99.85	*	92.81	92.86	92.63	94.42
<i>A. urinaeequi</i> DSM 20341	76.49	95.21	92.88	92.89	*	100.00	98.27	95.44
<i>A. urinaeequi</i> CCUG28094	76.75	95.27	92.92	92.93	100.00	*	98.34	95.47
<i>A. urinaeequi</i> USDA-ARS- USMARC-56713	76.40	95.04	92.80	92.82	98.29	98.29	*	95.29

**Методика интегральной оценки диагностической значимости полученных гемокультур при изучении инфекций кровотока**

В настоящее время следует учитывать выделение условно-патогенного микроорганизма в одном инокулированном кровью флаконе и наличие клинических признаков заболевания. Существующие подходы для определения клинической значимости полученных гемокультур и выделенных микроорганизмов не являются унифицированными по многим позициям.

Нами разработан клиничко-лабораторный подход к оценке клинической значимости полученных мономикробных и полимикробных гемокультур при ИК у терапевтических больных, который позволяет учитывать видовые, полимикробные характеристики гемокультур с клиническими симптомами в совокупности, как системное состояние (Таблица 6).

Таблица 6 – Разработанные группы клинической значимости микроорганизмов в гемокультурах при ИК

Группы клинической значимости эпизодов ИК			
Абсолютная			Вероятная
Рост в одной или двух пробах крови патогенного микроорганизма	Рост условно-патогенных микроорганизмов в двух пробах крови, взятых в течение суток или с интервалом в 30 минут	Рост условно-патогенных микроорганизмов в одной пробе крови при наличии клинических симптомов инфекционного процесса	Рост условно-патогенных микроорганизмов в разных пробах крови, взятых не в течение суток, при наличии клинических симптомов инфекционного процесса

Примечание: для полимикробных ИК критерии вышеперечисленных групп сохраняются

В клинические симптомы внесены показатели: повышенная температура тела, озноб, возраст, диагноз пациента, очаг инфекции, маркеры ИК. У кардиологических паци-

ентов определенные диагнозы рекомендуют микробиологическое исследование крови: ИЭ, ревматизм, врожденные пороки сердца (Таблица 7).

Таблица 7 – Клиническая значимость микроорганизмов при мономикробной ИК у кардиологических пациентов, n (%)

Клиническая значимость микроорганизмов при мономикробной ИК (n=277)							
Абсолютная, n=259 (93,5%)					Вероятная, n=18 (6,5%)		
1 гр.	2 гр.	3 гр.			4 гр.		
ПМ	УПМ*	УПМ** (t <sup>0</sup> )	УПМ*** (диагноз)	УПМ**** (очаги)	УПМ** (t <sup>0</sup> )	УПМ*** (диагноз)	УПМ**** (очаги)
55 (21,2)	33 (12,7)	82 (31,7)	85 (32,8)	4 (1,5)	8 (44,4)	9 (50,0)	1 (5,6)

Примечание: \* – два условно-патогенных микроорганизма (УПМ) в разных пробах крови, взятых с интервалом в 30 мин; \*\* – один УПМ при наличии лихорадки; \*\*\* – один УПМ при наличии диагноза, связанного с инфекцией; \*\*\*\* – один УПМ при наличии очага инфекции. ПМ – патогенный микроорганизм

Эпизоды мономикробной ИК имели «абсолютное» клиническое значение в 93,5% и в 6,5% случаев – «вероятное». Клиническая значимость полимикробной ИК представлена в таблице 8.

Таблица 8 – Клиническая значимость микроорганизмов при полимикробной ИК у кардиологических пациентов, n (%)

Клиническая значимость микроорганизмов при полимикробной ИК (n=73)							
Абсолютная n=62 (84,9%)					Вероятная n=11 (15,1%)		
1 гр.	2 гр.	3 гр.			4 гр.		
ПМ	УПМ*	УПМ** (t <sup>0</sup> )	УПМ*** (диагноз)	УПМ**** (очаги)	УПМ** (t <sup>0</sup> )	УПМ*** (диагноз)	УПМ**** (очаги)
25 (40,3)	13 (21,0)	17 (27,4)	5 (8,1)	2 (3,2)	4 (36,4)	7 (63,6)	-

Примечание: \* – два УПМ в разных пробах крови, взятых с интервалом в 30 мин; \*\* – один УПМ при наличии лихорадки; \*\*\* – один УПМ при наличии диагноза, связанного с инфекцией; \*\*\*\* – один УПМ при наличии очага инфекции. ПМ – патогенный микроорганизм

Эпизоды полимикробной ИК имели «абсолютное» клиническое значение в 84,9% и в 15,1% случаев – «вероятное».

Таким образом, для определения клинической значимости выделенных микроорганизмов при ИК необходимо учитывать ведущие клинические симптомы системного воспаления, основной диагноз, наличие очагов инфекции.

### **Особенности клинико-лабораторного обследования терапевтических больных при инфекции кровотока**

#### Характеристика больных

Данные анамнеза вносили в разработанные карты. Карта для госпитального больного включала анамнестические, клинические, клинико-лабораторные, микроскопические и бактериологические данные. Карта для внегоспитального пациента содержала анамнестические данные, жалобы пациента, сопутствующие заболевания.

При обследовании 1230 больных повышенную температуру тела отмечали 44,4% больных ИК. Прогноз положительного результата в 44,4% случаев показал, что повышенная температура тела маркирует ИК чаще, чем ее пропускает. У терапевтических больных повышенную температуру тела отмечали с заболеваниями системы кровообращения (42,0%), лихорадке неясного происхождения (ЛНП) (34,1%), заболеваниями кожи и подкожной клетчатки (12,1%), инфекционным эндокардитом (ИЭ) (44,7%), при

ревматизме (18,9%) и миокардите (16,7%). Температура тела повышалась одинаково при грамположительных, грамотрицательных, мономикробной и полимикробной ИК.

Среди 1230 больных ИК сопровождалась ознобом в 8 раз чаще, чем его отсутствием (88,8% и 11,2% соответственно;  $p < 0,001$ ), озноб расценили маркером ИК. Озноб при ИК отмечали больные заболеваниями системы кровообращения (53,1%), ЛНП (21,5%), заболеваниями кожи и подкожной клетчатки (12,6%), при ИЭ (47,1%), ревматизме (20,8%), миокардите (15,4%), ишемической болезни сердца (ИБС) (9,2%) и врожденных пороках сердца (ВПС) (7,5%). Озноб с высокой вероятностью развивался при наличии грамположительной, грамотрицательной, мономикробной и полимикробной ИК.

Из общего количества больных мужчины составляли 44,3%, женщины – 55,7%, но ИК диагностировалась в равных долях у мужчин и женщин (42,0% и 40,7% соответственно,  $p=0,65$ ). У мужчин чаще возникала госпитальная инфекция кровотока (ГИК) при заболеваниях системы кровообращения, включая ИЭ и ИБС. У женщин чаще возникала внегоспитальная инфекция кровотока (ВГИК) при заболеваниях кожи и подкожной клетчатки, при ревматизме и миокардите. Гендерных различий у пациентов при грамположительной, грамотрицательной, мономикробной и полимикробной ИК не отмечено.

В нашем исследовании все больные были распределены на 4 возрастные группы: до 44 лет (молодая), до 60 лет (средняя), до 75 лет (пожилая) и до 90 лет (старческая). До 44 лет ИК у больных встречалась чаще в 1,5 раза, чем в старческой (43,2% и 28,6% соответственно). Средний и пожилой возраст больных имели одинаковую частоту возникновения ИК (38,5% и 38,8% соответственно). ГИК возникала чаще, чем ВГИК у лиц молодого (в 1,4 раза), среднего возраста (в 2,7 раза), у пожилых людей (в 2,8 раза). Все пациенты старческого возраста перенесли ИК только в условиях стационара.

#### Верификация инфекции кровотока у терапевтических больных

Для верификации эпизодов ИК у терапевтических госпитальных и внегоспитальных больных обследовали 1230 человек и подтвердили ИК у 508 (41,3%) больных. ВГИК чаще характеризовалась грамположительными (36,9%), а ГИК – грамотрицательными (78,4%) и единичными грибковыми гемокультурами. ГИК осложняла заболевания системы кровообращения в 77,8% случаев, ВГИК возникала при заболеваниях кожи и подкожной клетчатки (41,0%), полости рта (15,8%), реже – органов дыхания (9,8%). У кардиологических больных ИК осложняла течение ИЭ (47,0%), ревматизма (22,1%), миокардита (14,6%), ИБС (8,7%) и ВПС (7,5%).

Микробиологическую характеристику ИК изучали на 2075 посевах крови и гемокультуру получили в 30,9% случаев. Этиологию ИК изучали на 642 полученных гемокультурах и 816 выделенных штаммах микроорганизмов (Таблица 9).

Таблица 9 – Характеристики выделенных штаммов микроорганизмов при ИК

Показатели	Микроорганизмы (n = 816)					
	Бактерии (98,4%)				Грибы (1,6%)	
	аэробные		анаэробные			
Всего, n (%)	682 (83,6)		121 (14,8)		13 (1,6)	
95% ДИ	80,9-86,0		12,6-17,4		0,9-2,7	
Показатели	Бактерии (n=803)				Грибы (n=13)	
	Грам (+) кокки	Грам (+) палочки	Грам (-) кокко/ бактерии	Грам (-) палочки	Дрожжи	Плесени
Всего, n (%)	480 (59,8)	228 (28,4)	20 (2,5)	75 (9,3)	7 (53,8)	6 (46,2)
95% ДИ	56,3-63,1	25,4-31,6	1,6-3,8	7,5-11,6	29,1-76,8	23,2-70,9

Бактериальную этиологию ИК отмечали чаще (98,4%), чем грибковую (1,6%). Состав бактерий характеризовался аэробными (83,6%) и анаэробными (14,8%) представителями. Среди бактерий грамположительные кокки преобладали над палочковыми формами (59,8% и 28,4% соответственно;  $p < 0,001$ ). Среди грамположительных кокков коагулазонегативные стафилококки составляли большинство (70,0%) и доминировал *S.epidermidis* (74,0%). Спектр выделенных микроорганизмов состоял из 32 родов аэробных, 8 родов анаэробных бактерий и 3 родов грибов (Таблица 10).

Таблица 10 – Видовой состав возбудителей ИК у терапевтических больных

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n= 816)		Индекс встречаемости ИВ, % (n = 642)
	абс.	%	
1	2	3	4
<b>Аэробные микроорганизмы</b>	682	83,6	106,2
<b>Грамположительные кокки</b>	472	57,8	73,5
<i>S.aureus</i>	34	4,2	5,3
<i>S.epidermidis</i>	244	29,9	38,0
<i>S.haemolyticus</i>	40	4,9	6,2
<i>S.hominis</i>	4	0,5	0,6
<i>S.lugdunensis</i>	1	0,1	0,2
<i>S.saprophyticus</i>	20	2,4	3,1
<i>S.sciuri</i>	7	0,9	1,1
<i>S.warneri</i>	3	0,4	0,5
<i>S.xylosum</i>	3	0,4	0,5
<i>S.capitis</i>	1	0,1	0,2
<i>S.auricularis</i>	1	0,1	0,2
<i>S.cohnii</i>	2	0,2	0,3
<i>S.hyicus</i>	4	0,5	0,6
<i>M.luteus</i>	3	0,4	0,5
<i>Sarcina spp.</i>	1	0,1	0,2
<i>R.mucilaginosa</i>	1	0,1	0,2
<i>S.pyogenes</i>	2	0,2	0,3
<i>S.mitis</i>	68	8,3	10,6
<i>S.mutans</i>	9	1,1	1,4
<i>S.salivarius</i>	3	0,4	0,5
<i>S.sanguinis</i>	2	0,2	0,3
<i>S.agalactiae</i>	1	0,1	0,2
<i>Leuconostoc spp.</i>	1	0,1	0,2
<i>E.faecalis</i>	14	1,7	2,2
<i>E.faecium</i>	3	0,4	0,5
<i>E.raffinoseus</i>	1	0,1	0,2
<b>Грамположительные неспоровые палочки</b>	99	12,1	15,4
<i>C.ulcerans</i>	22	2,7	3,4
<i>C.bovis</i>	6	0,7	0,9
<i>C.minutissimum</i>	12	1,5	1,9
<i>C.pseudotuberculosis</i>	8	1,0	1,2
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	2	0,2	0,3
<i>C.xerosis</i>	6	0,7	0,9
<i>C.jejkeium</i>	6	0,7	0,9
<i>C.kutscheri</i>	3	0,4	0,5
<i>Corynebacterium spp.</i>	8	1,0	1,2
<i>p.Kurthia</i>	10	1,2	1,6
<i>Tsukamurella paurometabola</i> *****	1	0,1	0,2
грам(+) аэробная	2	0,2	0,3

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4
<i>Listeria spp.</i>	1	0,1	0,2
<i>Nocardia spp.</i>	4	0,5	0,6
<i>A.viscosus</i>	1	0,1	0,2
<i>Actinomyces spp.</i>	5	0,6	0,8
<i>B.bostelensis</i>	1	0,1	0,2
<i>L.salivarius</i>	1	0,1	0,2
<b>Грамположительные споровые палочки</b>	22	2,7	3,4
<i>B.cereus</i>	10	1,2	1,6
<i>B.subtilis</i>	7	0,9	1,1
<i>B.polymyxa</i>	1	0,1	0,2
<i>B.megaterium</i>	2	0,2	0,3
<i>Bacillus spp.</i>	2	0,2	0,3
<b>Грамотрицательные кокки и коккобактерии</b>	17	2,1	2,6
<i>N.flava</i>	1	0,1	0,2
<i>N.flavescens</i>	1	0,1	0,2
<i>Branhamella catarrhalis****</i>	5	0,6	0,8
<i>A.lwoffii</i>	10	1,2	1,6
<b>Грамотрицательные палочки</b>	72	8,8	11,2
<i>S.enteritidis</i>	1	0,1	0,2
<i>E.coli</i>	19	2,3	3,0
<i>Klebsiella aerogenes**</i>	5	0,6	0,8
<i>K.pneumoniae</i>	2	0,2	0,3
<i>S.marcescens</i>	2	0,2	0,3
<i>S.liquefaciens</i>	5	0,6	0,8
<i>S.mariorubra*</i>	2	0,2	0,3
<i>E.cloacae</i>	4	0,5	0,6
<i>Pantoea agglomerans***</i>	5	0,6	0,8
<i>C.freundii</i>	1	0,1	0,2
<i>Citrobacter spp.</i>	1	0,1	0,2
<i>P.stuartii</i>	3	0,4	0,5
<i>P.aeruginosa</i>	5	0,6	0,8
<i>P.putida</i>	1	0,1	0,2
<i>P.maltophilia</i>	1	0,1	0,2
<i>Burkholderia cepacia*****</i>	5	0,6	0,8
<i>A.faecalis</i>	4	0,5	0,6
<i>P.vulgaris</i>	2	0,2	0,3
<i>H.haemolyticus</i>	4	0,5	0,6
<b>Анаэробные</b>	121	14,8	18,8
<b>Грамположительные кокки</b>	8	1,0	1,2
<i>Peptococcus spp.</i>	8	1,0	1,2
<b>Грамположительные палочки</b>	103	12,6	16,0
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2	0,2	0,3
<i>A.israelii</i>	1	0,1	0,2
<i>Cutibacterium acnes*****</i>	100	19,3	15,6
<b>Грамположительные споровые палочки</b>	4	0,5	0,6
<i>C.formicaceticum</i>	3	0,4	0,5
<i>Clostridium spp.</i>	1	0,1	0,2
<b>Грамотрицательные палочки</b>	3	0,4	0,5
<i>Fusobacterium spp.</i>	1	0,1	0,2
<i>B.fragilis</i>	2	0,2	0,3
<b>Грамотрицательные кокки</b>	3	0,4	0,5
<i>V.parvula</i>	3	0,4	0,5
<b>Грибы</b>	13	1,6	2,0

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4
<i>C.albicans</i>	5	0,6	0,8
<i>Rhodotorula spp.</i>	2	0,2	0,3
<i>A.niger</i>	6	0,7	0,9

Примечание:

\**Serratia marinorubra* (до 1980 г. *S.rubidaea*);

\*\**Klebsiella aerogenes* (до 2017 г. *K.mobilis*);

\*\*\**Pantoea agglomerans* (до 1989 г. *Enterobacter agglomerans*);

\*\*\*\**Branhamella catarrhalis* (до 1980 г. *Moraxella catarrhalis*);

\*\*\*\*\**Burkholderia cepacia* (до 1993 г. *Pseudomonas cepacia*);

\*\*\*\*\**Tsukamurella paurometabola* (до 1988 г. *Corynebacterium paurometabolum*);

\*\*\*\*\**Cutibacterium acnes* (до 2016 г. *Propionibacterium acnes*).

Индексы встречаемости (ИВ) относятся к математическому показателю и имеет применение в анализе медицинских исследований. Полимикробные гемокультуры были выделены в 21,8% случаев и состояли из двух, трех и четырех ассоциантов. Ассоциации микроорганизмов включали разные аэробные бактерии, аэробные бактерии с анаэробными, бактерии с грибами и разные анаэробные бактерии в одном флаконе (Таблица 11). По видовой характеристике в составе полимикробных гемокультур преобладали *S.epidermidis* (23,8%).

Таблица 11 – Характеристики ассоциантов в полимикробных гемокультурах

Показатель	Число ассоциантов полимикробных гемокультур (n = 140)			
	два	три	четыре	
Всего, n (%)	113 (80,7)	23 (16,4)	4 (2,9)	
95% ДИ	73,4-86,4	11,2-23,4	1,1-7,1	
Показатель	Характеристики ассоциантов полимикробных гемокультур (n = 140)			
	аэроб+аэроб	аэроб+анаэроб	бактерия+гриб	анаэроб+анаэроб
Всего, n (%)	89 (63,6)	43 (30,7)	6 (4,3)	2 (1,4)
95% ДИ	55,3-71,1	23,7-38,8	2,0-9,0	0,4-5,1

### Особенности госпитальной и внегоспитальной инфекций кровотока

Группа из 1230 терапевтических больных состояла из госпитальных (68,9%) и внегоспитальных (31,1%) пациентов. Из 2075 проб крови 76,8% приходилось на госпитальных и 23,2% – на внегоспитальных больных. Количество госпитальных больных превышало (2,2 раза) и число проб крови госпитальных больных превышало (3,3 раза) данные показатели внегоспитальных, а гемокультур получили больше у внегоспитальных больных (48,0%), чем у госпитальных (38,3%). Молодые люди в возрасте до 44 лет чаще страдали ВГИК (74,3%), а старше 45 лет – ГИК. Видовой пейзаж ГИК представлен в таблице 12.

Таблица 12 – Видовой спектр возбудителей ИК у госпитальных больных

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n= 519)		Индекс встречаемости ИВ, % (n=436)
	абс.	%	
1	2	3	4
<b>Аэробные микроорганизмы</b>	464	89,4	106,4
<b>Грамположительные кокки</b>	328	63,2	75,2
<i>S.aureus</i>	21	4,0	4,8
<i>S.epidermidis</i>	167	32,2	38,3
<i>S.haemolyticus</i>	34	6,6	7,8
<i>S.saprophyticus</i>	15	2,9	3,4

## Продолжение таблицы 12

1	2	3	4
<i>S.sciuri</i>	6	1,2	1,4
<i>S.warneri</i>	2	0,4	0,5
<i>S.xylosus</i>	2	0,4	0,5
<i>S.cohnii</i>	2	0,4	0,5
<i>S.hyicus</i>	4	0,8	0,9
<i>S.pyogenes</i>	1	0,2	0,2
<i>S.mitis</i>	54	10,4	12,4
<i>S.mutans</i>	7	1,3	1,6
<i>S.sanguinis</i>	2	0,4	0,5
<i>S.agalactiae</i>	1	0,2	0,2
<i>E.faecalis</i>	10	1,9	2,3
<b>Грамположительные палочки</b>	60	11,6	13,8
<i>C.ulcerans</i>	14	2,7	3,2
<i>C.bovis</i>	2	0,4	0,5
<i>C.minutissimum</i>	9	1,7	2,1
<i>C.pseudotuberculosis</i>	6	1,2	1,4
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	1	0,2	0,2
<i>C.xerosis</i>	5	1,0	1,1
<i>C.jejkeium</i>	5	1,0	1,1
<i>C.jejkeium</i>	5	1,0	1,1
<i>C.kutscheri</i>	3	0,6	0,7
<i>p.Kurthia</i>	9	1,7	2,1
грам(+) аэробная	1	0,2	0,2
<i>Nocardia spp.</i>	2	0,4	0,5
<i>A.viscosus</i>	1	0,2	0,2
<i>Actinomyces spp.</i>	1	0,2	0,2
<i>L.salivarius</i>	1	0,2	0,2
<b>Грамположительные споровые палочки</b>	20	3,9	4,6
<i>B.cereus</i>	9	1,7	2,1
<i>B.subtilis</i>	6	1,2	1,4
<i>B.polymyxa</i>	1	0,2	0,2
<i>B.megaterium</i>	2	0,4	0,5
<i>Bacillus spp.</i>	2	0,4	0,5
<b>Грамотрицательные кокки и коккобактерии</b>	11	2,1	2,5
<i>N.flavescens</i>	1	0,2	0,2
<i>Branhamella catarrhalis***</i>	4	0,8	0,9
<i>A.lwoffii</i>	6	1,2	1,4
<b>Грамотрицательные палочки</b>	45	8,7	10,3
<i>S.enteritidis</i>	1	0,2	0,2
<i>E.coli</i>	18	3,5	4,1
<i>K.aerogenes*</i>	1	0,2	0,2
<i>K.pneumoniae</i>	2	0,4	0,5
<i>S.liquefaciens</i>	1	0,2	0,2
<i>E.cloacae</i>	2	0,4	0,5
<i>Pantoea agglomerans**</i>	5	1,0	1,1
<i>C.freundii</i>	1	0,2	0,2
<i>Citrobacter spp.</i>	1	0,2	0,2
<i>P.stuartii</i>	3	0,6	0,7
<i>P.aeruginosa</i>	1	0,2	0,2
<i>P.maltophilia</i>	1	0,2	0,2
<i>A.faecalis</i>	2	0,4	0,5
<i>P.vulgaris</i>	2	0,4	0,5
<i>H.haemolyticus</i>	4	0,8	0,9

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4
<b>Анаэробные микроорганизмы</b>	49	9,4	11,2
<b>Грамположительные кокки</b>	3	0,6	0,7
<i>Peptococcus spp.</i>	3	0,6	0,7
<b>Грамположительные палочки</b>	37	7,1	8,5
<i>A.israelii</i>	1	0,2	0,2
<i>Cutibacterium acnes****</i>	36	6,9	8,3
<b>Грамположительные споровые палочки</b>	4	0,8	0,9
<i>C.formicaceticum</i>	3	0,6	0,7
<i>Clostridium spp.</i>	1	0,2	0,2
<b>Грамотрицательные палочки</b>	2	0,4	0,5
<i>B.fragilis</i>	2	0,4	0,5
<b>Грамотрицательные кокки</b>	3	0,6	0,7
<i>V.parvula</i>	3	0,6	0,7
<b>Грибы</b>	6	1,2	1,4
<i>C.albicans</i>	3	0,6	0,7
<i>A.niger</i>	3	0,6	0,7

Примечание:

\**Klebsiella aerogenes* (до 2017 г. *K.mobilis*);\*\**Pantoea agglomerans* (до 1989 г. *Enterobacter agglomerans*);\*\*\**Branhamella catarrhalis* (до 1980 г. *Moraxella catarrhalis*);\*\*\*\* *Cutibacterium acnes* (до 2016 г. *Propionibacterium acnes*).

Выделенные микроорганизмы (519) относились к 32 родам и 54 видам. Аэробные бактерии состояли из грамположительных кокков (63,2%), неспоровых палочек (11,6%), споровых (3,9%) и грамотрицательных палочек (8,7%) и грамотрицательных коккобактерий (2,1%), анаэробов (9,4%) и грибы (1,2%). Среди грамположительных кокков лидировал *S.epidermidis* (32,2%). Нами были проанализированы особенности полимикробных гемокультур (16,3%) (Таблица 13).

Таблица 13 – Характеристики ассоциантов в полимикробных гемокультурах, выделенных у госпитальных больных

Показатели полимикробных гемокультур (n = 71)	Число ассоциантов			p
	два	три		
Количество	61	10		<0,001
%	85,9	14,1		
95% ДИ	76,0-92,2	7,8-24,0		
Показатели полимикробных гемокультур	Характеристики ассоциантов (n = 71)			p
	аэроб+аэроб	аэроб+анаэроб	бактерия+гриб	
Количество	58	12	1	<0,001
%	81,7	16,9	1,4	
95% ДИ	71,2-89,0	9,9-27,3	0,2-7,6	

Полимикробные гемокультуры характеризовались двумя и тремя ассоциантами в одной пробе крови (85,9% и 14,1% соответственно; p <0,001). Полимикробность демонстрирует различные комбинации микроорганизмов: сочетание разных представителей аэробов (81,7%), аэробов с анаэробами (16,9%), бактерий с грибами (1,4%).

Видовой состав выделенных возбудителей ВГИК представлен в таблице 14.

Таблица 14 – Видовой состав возбудителей ИК у внегоспитальных больных

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n=297)		Индекс встречаемости ИВ, % (n=206)
	абс.	%	
1	2	3	4
<b>Аэробные микроорганизмы</b>	218	73,4	105,8
<b>Грамположительные кокки</b>	144	48,5	70,0
<i>S.aureus</i>	13	4,4	6,3
<i>S.epidermidis</i>	77	25,9	37,4
<i>S.haemolyticus</i>	6	2,0	2,9
<i>S.hominis</i>	4	1,3	1,9
<i>S.lugdunensis</i>	1	0,3	0,5
<i>S.saprophyticus</i>	5	1,7	2,4
<i>S.sciuri</i>	1	0,3	0,5
<i>S.warneri</i>	1	0,3	0,5
<i>S.xyloso</i>	1	0,3	0,5
<i>S.capitis</i>	1	0,3	0,5
<i>S.auricularis</i>	1	0,3	0,5
<i>M.luteus</i>	3	1,3	1,9
<i>Sarcina spp.</i>	1	0,3	0,5
<i>R.mucilaginosa</i>	1	0,3	0,5
<i>S.pyogenes</i>	1	0,3	0,5
<i>S.mitis</i>	14	4,7	6,8
<i>S.mutans</i>	2	0,7	1,0
<i>S.salivarius</i>	4	1,3	1,9
<i>Leuconostoc spp.</i>	1	0,3	0,5
<i>E.faecalis</i>	4	1,3	1,9
<i>E.faecium</i>	4	1,3	1,9
<i>E.raffinosis</i>	1	0,3	0,5
<b>Грамположительные палочки</b>	39	13,1	18,9
<i>C.ulcerans</i>	8	2,7	3,9
<i>C.bovis</i>	4	1,3	1,9
<i>C.minutissimum</i>	4	1,3	1,9
<i>C.pseudotuberculosis</i>	2	0,7	1,0
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	1	0,3	0,5
<i>C.xerosis</i>	1	0,3	0,5
<i>C.jejkeium</i>	1	0,4	0,5
<i>Corynebacterium spp.</i>	8	2,7	3,9
<i>p.Kurthia</i>	1	0,3	0,5
<i>Tsukamurella paurometabola</i> *****	1	0,3	0,5
грам(+) аэробная	1	0,3	0,5
<i>Listeria spp.</i>	1	0,3	0,5
<i>Nocardia spp.</i>	2	0,7	1,0
<i>Actinomyces spp.</i>	4	1,3	1,9
<i>B.bostelensis</i>	1	0,3	0,5
<b>Грамположительные споровые палочки</b>	2	0,7	1,0
<i>B.cereus</i>	1	0,3	0,5
<i>B.subtilis</i>	1	0,3	0,5
<b>Грамотрицательные кокки и кокко-бактерии</b>	6	2,0	2,9
<i>N.flava</i>	1	0,3	0,5
<i>Branhamella catarrhalis</i> ***	1	0,3	0,5
<i>A.lwoffii</i>	4	1,3	1,9
<b>Грамотрицательные палочки</b>	27	9,1	13,1
<i>E.coli</i>	1	0,3	0,5

## Продолжение таблицы 14

1	2	3	4
<i>Klebsiella aerogenes</i> **	4	1,3	1,9
<i>S.marcescens</i>	2	0,7	1,0
<i>S.liquefaciens</i>	4	1,3	1,9
<i>S.marinorubra</i> *	2	0,7	1,0
<i>E.cloacae</i>	2	0,7	1,0
<i>P.aeruginosa</i>	4	1,3	1,9
<i>P.putida</i>	1	0,3	0,5
<i>Burkholderia cepacia</i> ****	5	1,7	2,4
<i>A.faecalis</i>	2	0,7	1,0
<b>Анаэробные микроорганизмы</b>	72	24,2	35,0
<b>Грамположительные кокки</b>	5	1,7	2,4
<i>Peptococcus spp.</i>	5	1,7	2,4
<b>Грамположительные палочки</b>	66	22,2	32,0
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2	0,7	1,0
<i>Cutibacterium acnes</i> *****	64	21,5	31,1
<b>Грамположительные споровые палочки</b>	0	0,0	0,0
<b>Грамотрицательные палочки</b>	1	0,3	0,5
<i>Fusobacterium spp.</i>	1	0,3	0,5
<b>Грамотрицательные кокки</b>	0	0,0	0,0
<b>Грибы</b>	7	2,3	3,4
<i>C.albicans</i>	2	0,7	1,0
<i>Rhodotorula spp.</i>	2	0,7	1,0
<i>A.niger</i>	3	1,0	1,5

Примечание:

\**Serratia marenorubra* (до 1980г. *S.rubidaea*);

\*\**Klebsiella aerogenes* (до 2017 г. *K.mobilis*);

\*\*\**Branhamella catarrhalis* (до 1980 г. *Moraxella catarrhalis*);

\*\*\*\**Burkholderia cepatia* (до 1993 г. *Pseudomonas cepatia*);

\*\*\*\*\**Tsukamurella paurometabola* (до 1988 г. *Corynebacterium paurometabolum*);

\*\*\*\*\* *Cutibacterium acnes* (до 2016 г. *Propionibacterium acnes*).

Выделенные микроорганизмы относятся к 32 родам и 48 видам. К аэробам имели отношение грамположительные кокки (48,5%), грамположительные неспоровые палочки (13,1%) и споровые палочки (0,7%) и к грамотрицательным – коккобактерии (2,0%) и палочки (9,1%), анаэробы (24,2%), грибы (2,3%). Среди грамположительных кокков чаще выделяли *S.epidermidis* (25,9%). Особенности полимикробности ВГИК (33,5%) представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Характеристики ассоциантов в полимикробных гемокультурах у внегоспитальных больных

Показатель	Число ассоциантов в гемокультуре (n = 69)			Характеристики ассоциаций (n = 69)			
	два	три	четыре	аэроб+аэроб	аэроб+анаэроб	бактерия + гриб	анаэроб+анаэроб
Абс.	52	13	4	33	29	5	2
%	75,4	18,8	5,8	47,8	42,0	7,2	2,9
95% ДИ	64,0-84,0	11,4-29,6	2,3-14,0	36,5-59,4	31,1-53,8	3,1-15,9	0,8-10,0

В одном флаконе с кровью давали рост два, три и четыре разных микроорганизма (75,4%, 18,8% и 5,8% соответственно). Ассоциации полимикробности отличались сооб-

ществом, состоявшим из разных видов аэробных бактерий (47,8%), аэробных с анаэробными бактериями (42,0%), разных видов анаэробных бактерий (2,9%) и бактерий с грибами (7,2%).

Таким образом, при ГИК и ВГИК определяли чаще грамположительные, реже – граммотрицательные бактерии. Грибы в 2 раза чаще выделяли из крови при ВГИК, чем при ГИК. Среди грамположительных кокков у всех больных чаще высевали *S.epidermidis*. У пациентов ВГИК чаще в 2,6 раза выделяли анаэробные бактерии, чем у больных ГИК. Чаще в 2 раза были получены полимикробные гемокультуры при ВГИК (33,5%), чем при ГИК (16,3%), при ВГИК число ассоциантов достигало четырех (5,8%).

#### Визуализация инфекций кровотока у терапевтических больных

Для микроскопии мазков крови готовили по два стекла-мазка техникой «двух стекол», окрашивали по Граму и микроскопировали с использованием микроскопов: МИКРОМЕД-1, ЛОМО, Россия (иммерсионный объектив МИ 90-1,25 и окуляр К 7) и Axio Scope A1 (объектив ЕС Plan-NEOFLUAR 100x1,3; окуляр PI 10×23 Br foc, Carl Zeiss, Германия) (Рисунок 12).

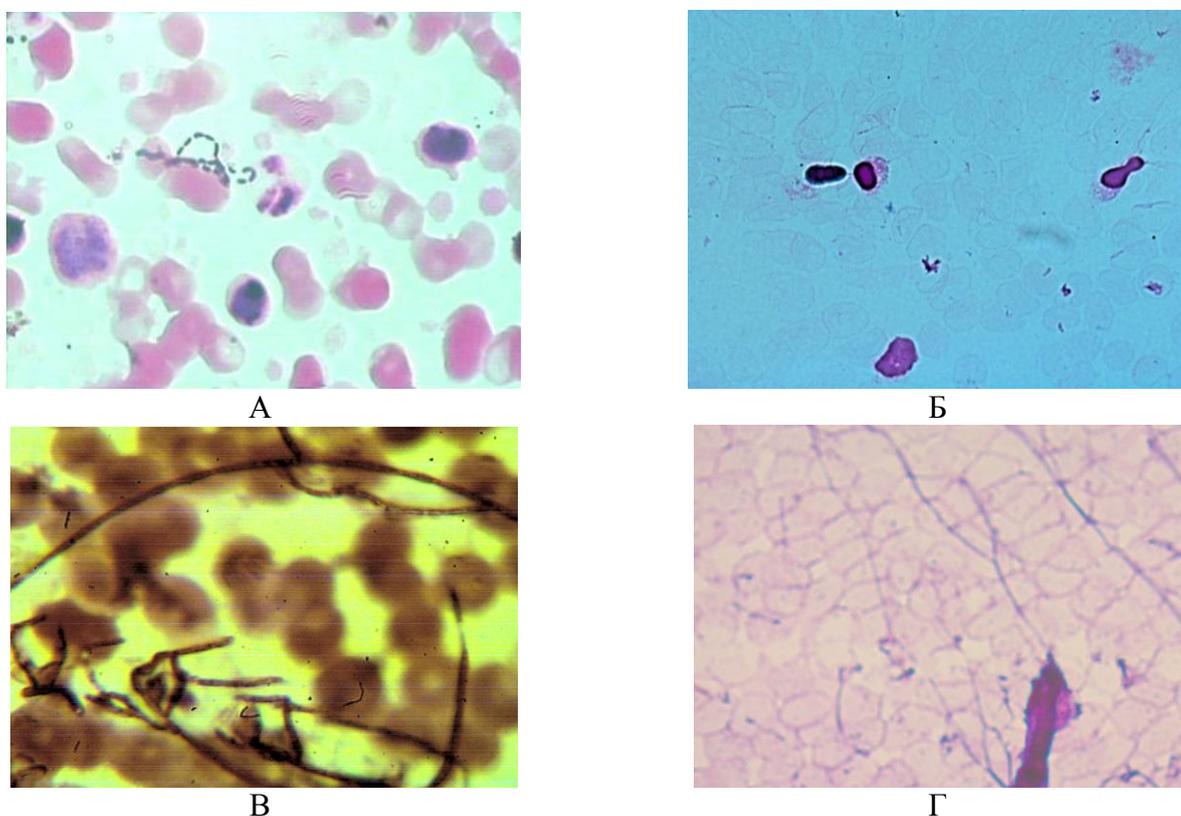


Рисунок 12 – Микрофотографии мазков лейкоцитарного слоя пробы крови (окрашивание по Граму)

Примечание: А – Цепочка грамположительных стрептококков; Б – Почкующиеся дрожжевые клетки; В и Г – нити псевдомицелия

При просмотре 1287 мазков проб крови терапевтических больных микроорганизмы обнаружены в 971 мазке (75,4%). При отрицательных гемокультурах микроорганизмы были обнаружены в 61,3% случаев, что позволяло клиницистам ориентировочно верифицировать ИК и подбирать эмпирическое антимикробное лечение.

Для оценки эффективности микроскопии мазков из лейкоцитарного слоя, как экспресс-диагностики ИК, анализировали 339 стекл-мазков внегоспитальных пациентов. Анализ показал, что ассоциации бактерий с грибами в 2,2 раза чаще обнаруживали, чем оп-

ределяли одни бактерии или одни грибы в мазках крови (66,9%, 31,0% и 2,1% соответственно). Всего элементов грибов было обнаружено в 69,0% случаев. Микроскопическая техника исследования крови позволила показать наличие двух форм диморфных грибов в крови: дрожжевые клетки и псевдомицелии.

Анализировали выявление микроорганизмов микроскопическим исследованием крови у больных с ИК при разных заболеваниях (Таблица 16).

Таблица 16 – Обнаружение микроорганизмов в мазках крови у больных ИК с разными терапевтическими заболеваниями

Болезни систем	Мазки крови абс. (%)	Мазки крови (n = 329)					
		в т. ч. мазки только с бактериями		в т. ч. мазки с ассоциациями бактерий с грибами		в т. ч. мазки только с грибами	
		абс. (% или доля)	95% ДИ	абс. (% или доля)	95% ДИ	абс. (% или доля)	95% ДИ
кровообращения	14 (4,3)	4 (28,6)	11,7-54,6	10 (71,4)	45,4-88,3	-	-
органов дыхания	23 (7,0)	10 (43,5)	25,6-63,2	13 (56,5)	36,8-74,4	-	-
кожи и подкожной клетчатки	142 (43,2)	31 (21,8)	15,8-29,3	109 (76,8)	69,2-82,9	2 (1,4)	0,4-5,0
полости рта	47 (14,3)	19 (40,4)	27,6-54,7	28 (59,6)	45,3-72,4	-	-
органов пищеварения	2 (0,6)	2 (2/2)	-	-	-	-	-
осложнения пластической хирургии	8 (2,4)	8 (8/8)	-	-	-	-	-
лихорадка неясного происхождения	78 (23,7)	23 (29,5)	20,5-40,4	51 (65,4)	54,3-75,0	4 (5,1)	2,0-12,5
прочие	15 (4,6)	5 (33,3)	15,2-58,3	9 (60,0)	35,7-80,2	1 (6,7)	1,2-29,8
Всего	329 (100,0)	102 (31,0)	26,2-36,2	220 (66,9)	61,6-71,7	7 (2,1)	1,0-4,3

Примечание: при  $n \leq 10$  относительный показатель представлен простой дробью, в числителе которой приведено абс. значение, а в знаменателе – объем группы

Чаще обнаруживали микроорганизмы в мазках крови у больных при заболеваниях кожи и подкожной клетчатки (43,2%), при ЛНП (23,7%), заболеваниях полости рта (14,3%). Исключительно бактерии в мазках крови отмечали у больных с заболеваниями органов дыхания (43,5%), полости рта (40,4%), при ЛНП (29,5%). Ассоциации бактерий с грибами чаще видели у больных при патологии кожи и подкожной клетчатки (76,8%), системы кровообращения (71,4%), при ЛНП (65,4%), полости рта (59,6%), органов дыхания (56,5%). Только грибы определяли у больных при остром течении ЛНП в 5,1% случаев.

Таким образом, индикация микроорганизмов в крови при ИК микроскопическим методом (75,4%) в пределах 2-х часов с момента взятия пробы крови позволяет определить его как экспресс-метод диагностики ИК. Результат обнаружения микроорганизмов микроскопическим методом превышал в 2 раза бактериологический и совпадение результатов этих методов наблюдали в 69,2% случаев. При отрицательных гемокультурах обнаружение микроорганизмов в мазках крови (61,3%) позволяло клиницистам подбирать эмпирическое antimicrobное лечение. Выявление дрожжевых клеток и нитей псевдомицелия при микроскопии в 66,9% случаев является важным диагностическим приемом при заболеваниях кожи и подкожной клетчатки, системы кровообращения, ЛНП и патологии полости рта.

### **Гематологические показатели крови при инфекции кровотока**

Гематологические показатели характеризовали до 72,0% высокую вероятность ИК при измененных уровнях клеток крови: повышение лимфоцитов, СОЭ, нейтрофилов (73,3%, 100,0% и 77,8% соответственно) и снижение гемоглобина (92,2%). Анализ отклонений клеток крови показал, что лимфоциты и нейтрофилы являются маркерами грамположительной мономикробной ИК. Лейкоциты – маркер грамотрицательной мономикробной ИК. СОЭ и гемоглобин – маркеры грамотрицательной полимикробной ИК.

### **Сывороточные белки крови при инфекции кровотока**

Белки крови реагировали на циркулирующие в крови микроорганизмы и показали до 91,4% вероятность ИК при измененных уровнях белков в крови: повышение фибриногена, С-реактивного белка (СРБ),  $\gamma$ -глобулина и  $\alpha_2$ -глобулина (97,4%, 100,0%, 88,9% и 85,0% соответственно) и снижение показателей количества общего белка и альбумин/глобулинового коэффициента (А/Г коэффициент) (90,5% и 100,0% соответственно). Анализ отклонений показателей белков крови показал, что повышенные значения фибриногена и  $\gamma$ -глобулина являются маркерами грамположительной полимикробной ИК. Появление СРБ и снижение количества общего белка характерно для грамотрицательной полимикробной ИК. Маркером грамположительной мономикробной ИК является снижение показателей А/Г коэффициента, а для грамотрицательной мономикробной ИК характерно повышение уровней  $\alpha_2$ -глобулина.

### **Роль принципов культуromики в повышении эффективности микробиологических исследований крови**

Культуромика – метод высокой эффективности получения культуры микроорганизма в силу конструирования модели условий для жизнедеятельности и роста микроорганизмов в искусственных условиях выращивания и использование MALDI-ToF-масс-спектрометрии для идентификации выделенных микроорганизмов. Культуромика характеризует достоинство и возрождение культурального метода, новый подход к выделению возбудителя перед другими методами при диагностике любого инфекционного заболевания. Нами сделана попытка использовать приемы культуromики для исследования крови с целью повышения эффективности гемокультивирования. Инновационный подход на модели гемокультивирования и диагностики ИК включал разработку инструментов и использование следующих приемов культуromики: 1) закрытая анаэробная система – флаконы для посева цельной крови; 2) взятие двух проб крови с интервалом в 30 мин; 3) соотношение крови к питательной среде как 1:20; 4) длительное культивирование крови; 5) анаэробные условия при гемокультивировании и субкультивировании; 6) сердечно-мозговая среда для посева цельной крови; 7) экспресс-метод получения гемокультуры; 8) сердечно-мозговой агар для посева лейкоцитарного слоя и субкультивирования; 9) анализ полимикробных гемокультур; 10) экспресс-метод обнаружения циркулирующих в кровотоке микроорганизмов; 11) выявление бактериального генома в пробе крови; 12) применение молекулярно-генетических методов для индикации и идентификации микроорганизмов в пробе крови, 13) применение MALDI-ToF-масс-спектрометрии.

Благодаря применению принципов микробиологической культуromики и различных условий для гемокультивирования и методов диагностики инфекции кровотока нами были получены следующие результаты.

При классическом методе использовали 2 пробы по 10 мл цельной крови и получали гемокультуры в 38,3% случаев, при экспресс-методе отбирали 1 пробу в 4,5 мл крови и рост гемокультур – в 48,0% случаев.

Инкубирование посевов крови более 7 дней позволило получить рост дополнительно 200 гемокультур, включая 16% полимикробных, выделение 239 штаммов, в числе которых 33,5% составляли клинически значимые микроорганизмы, анаэробные условия способствовали росту аэробных (89,5%), анаэробных (9,6%) бактерий и 2 штаммам грибов *p. Candida*.

При гемокультивировании выделили 816 штаммов микроорганизмов, включая 85,2% факультативно-анаэробных и 14,8% – анаэробных. В анаэробных условиях дали рост факультативно-анаэробные (42,2%) и строгие анаэробы (100,0%), т.е. 414 штаммов (50,7%), которые составили более половины выделенных возбудителей ИК. При субкультивировании материала «кровь-среда» факультативно-анаэробные микроорганизмы дали рост в аэробных условиях в 7,3% и анаэробных – 32,5%, т.е. анаэробные оказались в 4,5 раза эффективнее общепринятых аэробных условий.

Сравнение характера роста микроорганизмов на жидких средах показало, что на СКС дали рост 13,5% микроорганизмов, а на СМС – 40,6%, т.е. в 3 раза больше. Сравнении получения гемокультур показало, что полимикробных получили в 2,3 раза чаще на СМС, чем на СКС (37,6% и 16,7% соответственно) и полимикробных – в 4,3 раза чаще на СМС, чем на СКС (7,3% и 1,7% соответственно). Сравнение характера роста на агаровых средах при субкультивировании показало преимущество в 2,2 раза на СМА, чем на МПА в аэробных (37,5% и 17,3% соответственно) и в анаэробных условиях роста (50,3% и 22,6% соответственно).

2/3 выросших возбудителей ИК (75,4%) выявляли предварительно при микроскопии мазка крови в течение 1-2 часов с момента поступления пробы крови на исследование, а в случае отрицательной гемокультуры находкам микроорганизмов в мазках крови (61,3%) придавали диагностическое значение. Техника «шприц-пробирки» позволила обнаружить грибы в 69,0% случаев, включая две морфологические формы: дрожжевые клетки и псевдомицелий и бактериально-грибковый симбиоз (66,9%). Метод оценили, как экспресс-метод диагностики ИК.

В разработанные группы оценки клинической значимости полученных гемокультур и выделенных микроорганизмов при ИК включили клинические симптомы системного воспаления, основной диагноз, наличие очагов инфекции.

Современные масс-спектрометрические и молекулярно-генетические методы позволили идентифицировать две гемокультуры: *Rothia mucilaginosa* и *Brevibacillus bostelensis*, ранее не выделяемые из крови человека в России и провести полное секвенирование для определения нового вида рода *Aerococcus* spp. 1КР-2016.

Таким образом, применение концептуальных принципов и модулей культуромики для микробиологического исследования крови повысило эффективность получения гемокультуры и диагностики ИК.

### **Интегральные диагностические алгоритмы инфекции кровотока**

На основе применения принципов микробиологической культуромики разработаны интегральные алгоритмы диагностики инфекции кровотока, составляющие систему микробиологического исследования крови и включающие классические, альтернативные и экспрессные методы исследования крови, которые воспроизводимы в лабораториях федерального, регионального, городского и районного уровней (Рисунок 13).

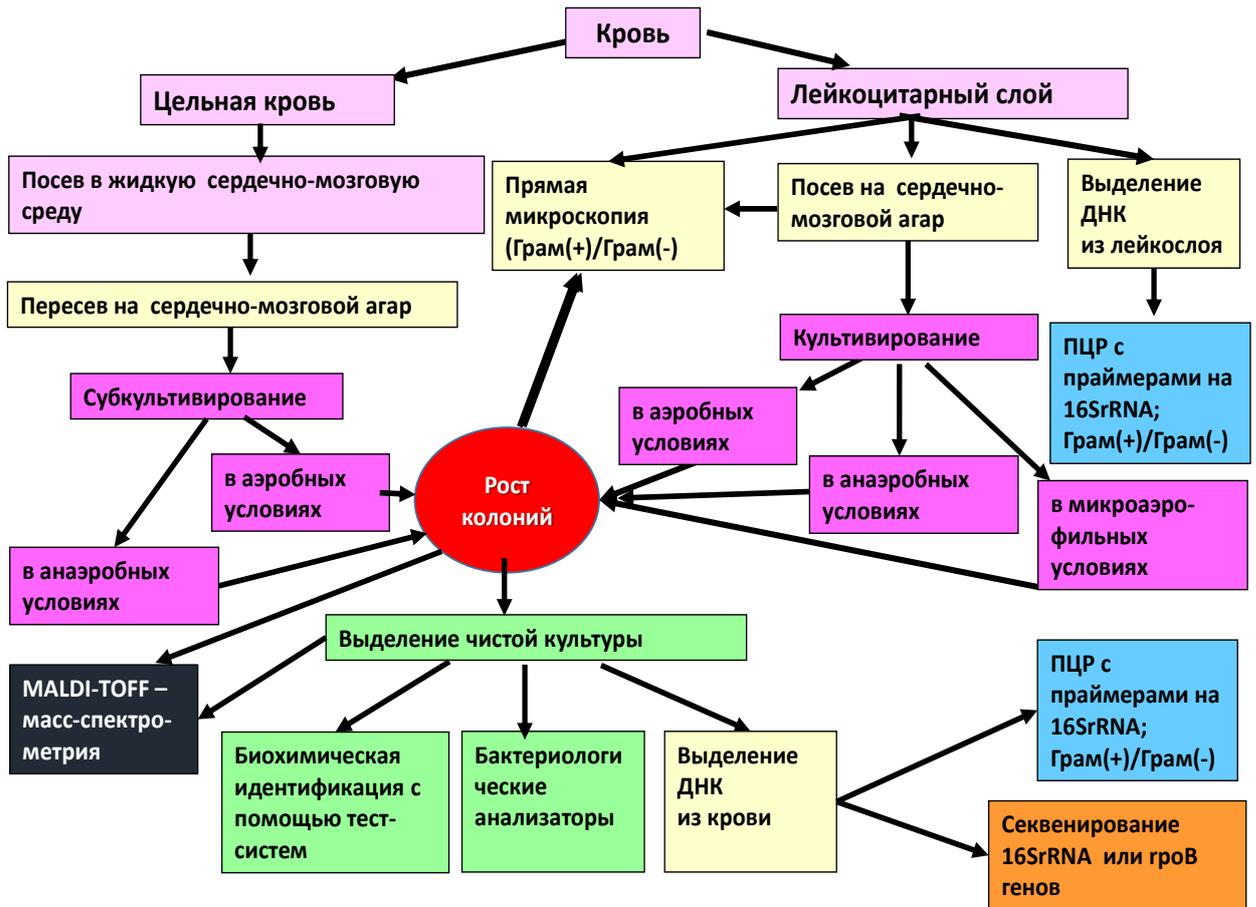


Рисунок 13 – Интегральный диагностический алгоритм при инфекции кровотока

Алгоритмы предлагают использовать любые варианты гемокультивирования: традиционный посев цельной крови во флакон с питательной средой или экспресс-посев лейкоцитарного слоя на питательный агар. При любом варианте исследования крови необходимо соблюдать принципы системы гемокультивирования, которые состоят из:

- 1) посев цельной крови в питательную среду в соотношении объема крови к объему питательной среды как 1:10–1:20;
- 2) использование закрытой анаэробной системы в виде флакона с жидкой высокопитательной средой, с резиновой пробкой, завальцованным металлическим колпачком и наполненным инертным газом;
- 3) посев лейкоцитарного слоя пробы крови на чашки Петри с высокопитательным агаром и гемолизированной кровью методом «рассева»;
- 4) культивирование флаконов с инокулированной цельной кровью в анаэробных условиях;
- 5) культивирование посевов лейкоцитарного слоя пробы крови в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях параллельно;
- 6) для получения лейкоцитарного слоя использовать стерильно приготовленные центрифужные пробирки с цитратом натрия или одноразовые промышленного производства вакуумные пробирки с цитратом натрия («шприц-пробирка»);

7) для любого вида гемокультивирования использовать высокопитательные сердечно-мозговые среды: жидкие – во флаконе и агаровые – для посева лейкоцитарного слоя пробы крови и субкультивирования;

8) при субкультивировании посевов материал из флаконов отбирать одноразовыми шприцами путем прокола резиновой пробки флакона без открывания флакона, культивировать в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях параллельно;

9) для микроскопии мазка крови получать лейкоцитарный слой по описанному выше способу;

10) идентификация и определение резистентности к антибиотикам проводить с помощью общепринятых бактериологических методов, включая масс-спектрометрический метод;

11) для диагностики инфекции в цельной крови в день взятия пробы получать лейкоцитарный слой и использовать его для индикации и идентификации ДНК микроорганизмов с помощью nested-ПЦР-диагностики;

12) результаты микроскопии крови и ПЦР-диагностики лейкоцитарного слоя пробы крови передавать клиницисту для назначения эмпирической антимикробной терапии.

Разработанная система микробиологического исследования крови позволяет диагностировать инфекцию в кровотоке при наличии в лаборатории автоматизированных гемокультуральных систем. В случае отсутствия автоматизированных импортных систем целесообразно использовать для посева лейкоцитарный слой пробы крови, так как данный метод не требует приготовления флаконов с питательной средой в лабораторных условиях. В экстренном случае при жизнеугрожающем состоянии больного возможно использовать лейкоцитарный слой пробы крови для микроскопического и молекулярно-генетического исследования (nested-ПЦР) для индикации и определения Грам-принадлежности возбудителя в крови. При полимикробности в виде бактериально-грибковых ассоциаций инфекции кровотока микроскопическое исследование лейкоцитарного слоя играет важную диагностическую роль. Определение гематологических и биохимических показателей крови в роли маркеров инфекции крови дополнительно подтвердят ранние микробиологические находки в крови.

## ВЫВОДЫ

1. С учетом современных принципов культуromики разработана модель исследования гемокультуры, практическое применение которой значительно повысило эффективность этиологической диагностики инфекций кровотока. Это позволило в 41,3% случаев получить микробиологическое подтверждение у пациентов терапевтического профиля.

2. Разработаны и внедрены ускоренные методы обнаружения микроорганизмов в пробах гемокультур с помощью прямой визуализации, применения высокопитательных сред и условий вариативного культивирования, которые повысили уровень верификации клинического диагноза инфекции кровотока. Общая частота обнаружения микроорганизмов в крови составила 75,4%, в том числе 48% положительных гемокультур у больных.

3. Микробиологические исследования крови, проведенные с учетом принципов современной культуromики, установили доминирующее положение грамположительных факультативно-анаэробных кокков, представленных преимущественно группой коагулазоотрицательных стафилококков, из которых *S.epidermidis* составил 74,0%.

4. Принимая во внимание сложный генез многих терапевтических заболеваний, сопровождающихся инфекцией кровотока, рационально использовать интегральный диагностический принцип изучения и оценки результатов широкого спектра клинико-

лабораторных методов. По нашим данным это маркеры воспаления из числа симптоматических, гематологических и биохимических показателей, которые также являются ценными прогностическими признаками инфекции кровотока.

5. Наиболее значимыми диагностическими клинико-лабораторными маркерами были у терапевтических пациентов с инфекциями кровотока:

- повышенная температура тела, озноб;
- анемия, нейтрофильный лейкоцитоз, лимфоцитоз;
- повышенная СОЭ, увеличение показателей СРБ, фибриногена, альфа 2-глобулина и гамма-глобулина на фоне снижения количества общего белка и альбумин-глобулинового коэффициента.

6. Разработанная на принципах современной культуромики модель и полученные с ее помощью результаты исследования гемокультуры позволяют рекомендовать ее для широкого применения с целью повышения эффективности этиологической диагностики инфекционно-воспалительных заболеваний, где предусмотрено исследование таких биологических жидкостей, как моча, ликвор, пунктаты из стерильных полостей и органов.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Диагностику инфекции кровотока рекомендуется проводить по разработанному нами алгоритму, соблюдая принципы культуромики и систему микробиологического исследования крови, для повышения диагностической эффективности при гемокультивировании.

2. При подозрении на инфекцию в крови использовать альтернативный экспресс-метод прямого посева лейкоцитарного слоя пробы крови, который показал себя более эффективным способом получения гемокультуры, чем традиционный посев цельной крови во флакон с питательной средой и не требует зарубежных гемокультуральных систем или флаконов с двухфазной средой лабораторного приготовления.

3. Для выявления бактериальных, грибковых форм и их ассоциаций применять экспресс-метод прямого обнаружения микроорганизмов методом микроскопии лейкоцитарного слоя пробы крови, рост которых не получают в гемокультуре, с учетом того, что в настоящее время бактериально-грибковые ассоциации представляют угрозу в силу нарастания их участия в инфекционных процессах.

4. Выделенные из крови у терапевтических больных условно-патогенные микроорганизмы принимать за истинных возбудителей инфекции кровотока при наличии клинических симптомов и клинико-лабораторных маркеров инфекции кровотока.

5. Анаэробные газовые условия на всем протяжении процесса гемокультивирования содействуют повышению эффективности получения гемокультуры и диагностики инфекции кровотока, поэтому необходимо обеспечить специализированным оснащением бактериологические лаборатории с курсом обучения специалистов.

6. Высокопитательные сердечно-мозговые среды необходимы для эффективного микробиологического исследования любого биоматериала, включая процесс гемокультивирования, поэтому рекомендуется организовать производство отечественных сердечно-мозговых сред, которые решат государственную программу замещения импортных дорогостоящих сред.

7. Разработанные молекулярно-генетические методики индикации и идентификации микроорганизмов при использовании лейкоцитарного слоя пробы крови использовать в экстренных диагностических случаях и для контроля микробиологического исследования крови.

8. Рекомендуется включить в программу циклов повышения квалификации по клинической микробиологии современную разработанную систему микробиологического исследования крови, включая экспрессные техники получения гемокультуры и диагностики инфекции кровотока.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дальнейшая перспектива разработки лабораторной диагностики инфекции кровотока заключается в расширение применения принципов культуромики с целью повышения диагностической эффективности и для этого нами предполагается разработать технологию количественного определения циркулирующих микроорганизмов в кровотоке.

Экспресс-метод получения гемокультуры сокращает время получения ее и показывает хороший результат выделения микроорганизмов из крови у терапевтических больных, поэтому следует разработать программу по внедрению данного метода при различных патологических состояниях в лабораториях страны.

Экспресс-метод обнаружения инфекции в крови микроскопическим методом показал высокую диагностическую эффективность актуальной проблемы бактериально-грибковых ассоциаций, поэтому планируется проведение мастер-класса данного метода диагностики для микробиологов страны.

Используя предложенную рецептуру и апробирование высокопитательных сердечно-мозговых сред (жидкой и агаровой), разработать техническую документацию совместно с технологами производства питательных сред в формате запуска производства сердечно-мозговых сред в стране с целью импортного замещения сред зарубежных фирм.

Изучить процесс восстановления L-форм микроорганизмов, циркулирующих в кровотоке, при хронических и вялотекущих заболеваниях, инвазивных микозах и генерализованных патологических состояниях.

Учитывая, что в патогенезе инфекции кровотока играет роль транслокация кишечной флоры в кровотоки, расширить линейку диагностики инфекции кровотока в плане сопоставления микробиологических данных исследования крови и кала при нарушении баланса кишечной микробиоты.

Провести параллельные микробиологические исследования крови и мочи с целью мониторинга циркуляции микроорганизмов при инфекции в крови.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Федоров, В.В. Экспресс-диагностика бактериемий / В.В. Федоров, Н.М. Каргальцева, В.И. Кочеровец // Клиническая лабораторная диагностика. – 1995. – № 1. – С. 42–45.

2. Федоров, В.В. Экспресс-диагностика бактериемии у больных инфекционным эндокардитом / В.В. Федоров, Н.М. Каргальцева, М.А. Куликова // Клиническая лабораторная диагностика. – 1995. – № 4. – С. 48–49.

3. Kargaltseva, N. Early diagnosis of bacteriemia with peripheral blood smear in Infective Endocarditis / N. Kargaltseva // 7<sup>th</sup> European congress of clinical microbiology and infectious diseases, ESCMID: Abstract book, Vienna, Austria, 26-30 March 1995. – 1995. – № 140. – P. 27.

4. Kargaltseva, N. Comparison of anaerobic bacteremia in surgical and nonsurgical patients / N. Kargaltseva, V. Kocherovetz, A. Burbello, E. Sapronova, I. Kargaltseva // 2<sup>nd</sup> World Congress on anaerobic bacteria and infections: Abstract book, Nice, France, 3-6 October, 1998. – 1998. – № 7.004. – P. 90.

5. **Kargaltseva, N.** Fungemia in outpatients with furunculosis / **N. Kargaltseva, V. Kocherovets, I. Konyaev, M. Burbello, E. Sapronova, I. Kargaltseva** // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2000. – Vol. 6, № 1: 10<sup>th</sup> European Congress of Clin. Microbiology and Infect. Dis. Stockholm, Sweden, 28-31 May 2000. — P. 29.

6. **Каргальцева, Н.М.** Микробиологические особенности бактериемии у кардиологических больных / **Н.М. Каргальцева** // *Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии имени И.И. Мечникова*. – 2007. – Т. 2, № 2. – С. 72-73.

7. **Каргальцева, Н.М.** Микробиологическое представление инфекции кровотока / **Н.М. Каргальцева** // *МВФ. Медицина. Фармация*. – 2007. – № 1. – С. 30–36.

8. **Кочеровец, В.И.** Забор материала для микробиологического исследования у больных с заболеваниями лорорганов / **В.И. Кочеровец, Ю.К. Янов, Н.М. Каргальцева, М.В. Молчанова, К.В. Айрапетян** // *Российская отоларингология*. – 2008. – № 2 (33). – С. 48–59.

9. **Kargaltseva, N.** Blood smear microscopy in diagnosis of bacteremia and fungemia / **N. Kargaltseva** // 2<sup>nd</sup> ICCAID: Abstract book, Almaty, Kazakhstan, 27–30 March, 2008. – 2008. – № P-134. – P. 144–145.

10. **Добрынина, Н.В.** Экспресс-диагностика бактериемии и ее значение у больных внутрибольничной пневмонией / **Н.В. Добрынина, А.Т. Бурбелло, Н.М. Каргальцева** // *Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова*. – 2009. – Т. 2, № 31. – С. 172–176.

11. **Каргальцева, Н.М.** Клинические и микробиологические особенности инфекции кровотока / **Н.М. Каргальцева, А.Т. Бурбелло, В.И. Кочеровец, А.С. Федоренко** // *Профилактическая и клиническая медицина*. – 2010. – Т. 35, № 2. – С. 145–148.

12. **Каргальцева, Н.М.** Современный взгляд на микробиологическое исследование крови / **Н.М. Каргальцева** // *Инфекция в хирургии*. – 2010. – Т. 8, № 3. – С. 19–22.

13. **Федоренко, А.С.** Подбор антибактериальной терапии по данным экспресс-микроскопии и посева лейкоцита крови / **А.С. Федоренко, П.М. Лукьянова, А.Т. Бурбелло, Н.В. Добрынина, Н.М. Каргальцева** // *Ремедиум*. – 2011. – № 4. – С. 141–142.

14. **Елисеев, А.В.** Бактериоскопический метод исследования крови и мокроты при диагностике заболеваний нижних отделов дыхательных путей / **А.В. Елисеев, Н.М. Каргальцева, П.М. Лукьянова** // *Профилактическая и клиническая медицина*. – 2011. – Т. 3, № 40. – С. 348–351.

15. **Каргальцева, Н.М.** Клинико-лабораторный подход к обследованию амбулаторных пациентов с инфекцией кровотока / **Н.М. Каргальцева, В.Л. Пастушенков, В.И. Кочеровец** // *Клинико-лабораторный консилиум*. – 2011. – Т. 1, № 37. – С. 49–56.

16. **Каргальцева, Н.М.** Полимикробность гемокультур – современная тенденция в этиологии инфекции кровотока / **Н.М. Каргальцева, В.И. Кочеровец, А.М. Иванов** // *Практическая медицина*. – 2012. – Т. 1, № 56. – С. 56–62.

17. **Каргальцева, Н.М.** Современные этиологические особенности инфекционного эндокардита / **Н.М. Каргальцева, А.М. Иванов, В.И. Кочеровец, В.Л. Пастушенков** // *Практическая медицина*. – 2013. – Т. 5, № 74. – С. 91–98.

18. **Kargaltseva, N.** Bloodstream infection episodes in outpatients in Saint-Petersburg, Russia / **N. Kargaltseva, A. Ivanov, A. Eliseev** // 23<sup>rd</sup> ECCMID: Abstract book, Berlin, Germany, 27-30 April, 2013. – 2013. – № R-2794. – С. 325.

19. **Kargaltseva, N.** Clinical signification of endogenous intoxication indexes at bloodstream infection / **N. Kargaltseva, V. Kocherovets, A. Eliseev, M. Suvorova** // 24<sup>th</sup> ESCMID: Abstract book, Barcelona, Spain, 10–13 May, 2014. – 2014. – № R-399. – С. 272.

20. **Борисова, О.Ю.** Первый случай выделения в России *Rothia mucilaginosa* из крови пациентки с осложнениями после контурной пластики / **О.Ю. Борисова, В.А. Алешкин, Н.М. Каргальцева, В.И. Кочеровец, В.Л. Пастушенков, Е.И. Карпова, О.И. Данищук, С.С. Афанасьев** // Медицинский альманах. – 2015. – № 5 (40). – С. 93-96.

21. **Каргальцева, Н.М.** Микробиологические особенности инфекции кровотока при дисбиозе кишечника / **Н.М. Каргальцева, О.Ю. Борисова, В.А. Алешкин, В.И. Кочеровец, В.Л. Пастушенков** // НАСКИ. Медицинское обозрение. Наука и практика. – 2015. – Т. 1, № 3. – С. 42-43.

22. **Каргальцева, Н.М.** Особенности ассоциации грибов с бактериями при инфекции кровотока у терапевтических пациентов с разными патологическими состояниями / **Н.М. Каргальцева, О.Ю. Борисова, В.А. Алешкин, В.И. Кочеровец, В.Л. Пастушенков** // Успехи медицинской микологии. – 2015. – Т. XIV: материалы III междунар. микологического форума, Москва, 14–15 апреля 2015 г. – С. 128.

23. **Алешкин, В.А.** Микробиологические особенности субфебрилитета и озноба у амбулаторных больных / **В.А. Алешкин, О.Ю. Борисова, Н.М. Каргальцева, В.И. Кочеровец, В.Л. Пастушенков** // Инфекционные болезни. – 2015. – Т. 13. – Приложение 1: материалы VII Ежегод. Всеросс. конгр. по инф. болезням с междунар. участием, Москва, 30 марта – 1 апреля, 2015 г. – С. 16–17.

24. **Каргальцева, Н.М.** Клинико-лабораторные показатели инфекции кровотока у курящих пациентов / **Н.М. Каргальцева, В.И. Кочеровец, О.Ю. Борисова, В.Л. Пастушенков** // Лабораторная диагностика в решении проблем современной клинической медицины: материалы Всеросс. научно-практ. конф., Санкт-Петербург, 8-9 декабря 2015 г. – 2015. – С. 38.

25. **Каргальцева, Н.М.** Экспресс-методы для обнаружения, выделения и идентификации возбудителей при инфекции кровотока / **Н.М. Каргальцева, В.И. Кочеровец, О.Ю. Борисова** // Новые методы экспресс-диагностики микроорганизмов в медицине, фармации, ветеринарии экологии: материалы Всеросс. научно-практ. конф., Санкт-Петербург, 15-16 октября 2015. – 2015. – С. 218-220.

26. **Каргальцева, Н.М.** Клинические маркеры инфекции кровотока у амбулаторных пациентов / **Н.М. Каргальцева, О.Ю. Борисова, А.Ю. Миронов, В.А. Алешкин, В.И. Кочеровец, В.Л. Пастушенков, А.Б. Бутенко** // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61, № 8. – С. 494–497.

27. **Каргальцева, Н.М.** Современная этиологическая картина миокардита / **Н.М. Каргальцева, О.Ю. Борисова, В.И. Кочеровец, В.А. Алешкин** // Проблемы медицинской микологии. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 72–73.

28. **Каргальцева, Н.М.** Роль питательной среды в получении гемокультуры / **Н.М. Каргальцева, О.Ю. Борисова, В.И. Кочеровец, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин** // Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т. 6, № 3: материалы. II Нац. конгр. бактериологов, Санкт-Петербург, 20-22 сентября 2016 г. – С. 256.

29. **Каргальцева, Н.М.** Микроскопия мазка крови как способ быстрой диагностики фунгемии у стационарных терапевтических больных / **Н.М. Каргальцева, О.Ю. Борисова, В.И. Кочеровец** // Успехи медицинской микологии. – 2016. – Т. XV, гл. 2. – С. 68–69.

30. **Каргальцева, Н.М.** Этиологическая роль дрожжеподобных грибов р.Candida при инфекции кровотока у амбулаторных пациентов / **Н.М. Каргальцева, О.Ю. Борисова, В.И. Кочеровец, Е.В. Сапронова, Е.А. Еденюк** // Успехи медицинской микологии. – 2017. – Т. XVII, гл. 4: материалы IV съезда микологов, Москва, 12-14 апреля 2017 г. – С. 300–301.

31. **Каргальцева, Н.М.** Интегральные гематологические индексы – маркеры интоксикации при бактериемии у терапевтических больных / **Н.М. Каргальцева, О.Ю. Борисова, В.И. Кочеровец, Е.В. Сапронова, Е.А. Еденюк** // Лабораторная служба. – 2017. – Т. 6, № 3: материалы III Росс. конгр. лабор. медицины, Москва, 11-13 октября 2017 г. – С. 29.

32. **Каргальцева, Н.М.** Грамположительная бактериемия у терапевтических больных / **Н.М. Каргальцева, О.Ю. Борисова, В.И. Кочеровец** // Бактериология. – 2017. – Т. 2, № 3: материалы III Нац. конгр. бактериологов, Москва, 16–17 ноября 2017 г. – С. 66.

33. **Каргальцева, Н.М.** Традиции и новации в технике микроскопии крови / **Н.М. Каргальцева** // Лабораторная диагностика – клинической медицине: традиции и новации : материалы научно-практ. конф., посвященной 95-летию со дня рождения члена-корр. РАМН Б.Ф. Коровкина, Санкт-Петербург, 4-5 декабря, 2018. – 2018. – С. 31.

34. **Каргальцева, Н.М.** Маркеры воспаления и инфекция кровотока (обзор литературы) / **Н.М. Каргальцева, О.Ю. Борисова, В.И. Кочеровец, А.Ю. Миронов, А.Т. Бурбелло** // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 64, № 7. – С. 435-442.

35. **Каргальцева, Н.М.** Метод получения гемокультуры при диагностике инфекции кровотока / **Н.М. Каргальцева, В.И. Кочеровец, А.Ю. Миронов, О.Ю. Борисова** // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 185–190.

36. **Каргальцева, Н.М.** Сердечно-мозговые среды для гемокультур / **Н.М. Каргальцева, В.И. Кочеровец, А.Ю. Миронов, О.Ю. Борисова** // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, № 6. – С. 375–381.

37. **Каргальцева, Н.М.** Экспресс-диагностика инвазивного микоза / **Н.М. Каргальцева** // Проблемы медицинской микологии. – 2021. – Т. 23, № 2: материалы Всеросс. конгр. по мед. микробиологии, клинической микологии и иммунологии, Санкт-Петербург, 9–11 июня 2021 г. – С. 86.

38. **Каргальцева, Н.М.** Система микробиологического исследования крови / **Н.М. Каргальцева, В.И. Кочеровец, О.Ю. Борисова** // Бактериология. – 2021. – Т. 6, № 3: материалы VI Нац. конгресса бактериологов, Казань, 14-16 сентября 2021 г. – С. 36-37.

#### Патенты на изобретения

1. Патент RU 2 098 486 C1 Российская Федерация, МПК 6 C12Q 1/04. Способ диагностики бактериемии / **Н.М. Каргальцева**; заявитель и правообладатель Каргальцева Н.М. – № 2098486; заявл. 23.06.1995; опубл. 10.12.1997; Бюл. № 34. – 6 с.

2. Патент RU 2 496 108 C1 Российская Федерация; МПК G01N 33/49. Способ определения целесообразности проведения иммунологического обследования у больных хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями различной локализации / **А.С. Федоренко, А.Т. Бурбелло, Л.Б. Гайковая, Н.М. Каргальцева**; заявитель и правообладатель ГБОУ ВПО СЗГМУ имени И.И. Мечникова Министерства здравоохранения и социального развития РФ. – № 2496108; заявл. 07.06.2012; опубл. 20.10.2013; Бюл. № 29. – 14 с.

3. Патент RU 2 616 249 C1 Российская Федерация; МПК G01N 33/48. Способ экспресс-диагностики инфекции кровотока / Н.М. Каргальцева, В.И. Кочеровец, О.Ю. Борисова, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин, А.В. Елисеев; заявитель и правообладатель ФБУН МНИИЭМ имени Г.Н. Габричевского Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2616249; заявл. 20.01.2016; опубл. 13.04.2017; Бюл. № 11. – 12 с.

4. Патент RU 2 650 863 C1 Российская Федерация; МПК C12N 1/20 C12R 1/01. Сердечно-мозговая среда для диагностики инфекции в кровотоке и способ ее получения / Н.М. Каргальцева, В.И. Кочеровец, О.Ю. Борисова, В.Л. Пастушенков, С.С. Афанасьев; заявитель и правообладатель ФБУН МНИИЭМ имени Г.Н. Габричевского Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2650863; заявл. 13.02.2017; опубл. 17.04.2018; Бюл. № 11. – 14 с.

5. Патент RU 2 660 708 C1 Российская Федерация; МПК G01N 33/53 C12Q 1/04. Способ получения питательной среды для выделения гемокультуры при диагностике инфекции кровотока / Н.М. Каргальцева, О.Ю. Борисова, В.И. Кочеровец, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, В.Л. Пастушенков, М.С. Афанасьев; заявитель и правообладатель ФБУН МНИИЭМ имени Г.Н. Габричевского Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2660708; заявл. 29.09.2017; опубл. 09.07.2018; Бюл. № 19. – 13 с.

#### Методические рекомендации

1. Инфекционный эндокардит (диагностика, лечение, профилактика). Методические рекомендации утверждены Заместителем министра Министерства здравоохранения и Медицинской промышленности 28.04.1994 г. / В.В. Федоров, Е.И. Рубашкина, Н.А. Новикова, **Н.М. Каргальцева**, М.А. Куликова. – Санкт-Петербург, 1994. – 33 с.

2. Прогнозирование исхода у больных острым перитонитом на основании данных клинико-микроскопического обследования. Методические рекомендации СПб ГМА имени И.И. Мечникова МЗ РФ / С.А. Шляпников, **Н.М. Каргальцева**, В.В. Федорова. – Санкт-Петербург, 2003. – 8 с.

3. Микробиологические методы диагностики инфекции кровотока. Методические рекомендации для врачей утверждены Первым заместителем Председателя Комитета по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга 02.06.2009 г. / **Н.М. Каргальцева**, В.И. Кочеровец, Л.А. Кафтырева, В.Л. Пастушенков, Е.Н. Колосовская, Е.В. Кучеренко, Н.В. Сатосова. – Санкт-Петербург, 2009. – 32 с.

4. Микробиологические методы диагностики инфекции кровотока. Методические рекомендации для врачей 2-е издание, исправленное / **Н.М. Каргальцева**, В.И. Кочеровец, Л.А. Кафтырева, В.Л. Пастушенков, Е.В. Кучеренко, Н.В. Сатосова. – Санкт-Петербург, 2010. – 42 с.

5. Практические рекомендации по лабораторной диагностике анаэробной инфекции / М.А. Сухина, С.М. Юдин, А.В. Загайнова, В.В. Макаров, Ю.А. Шельгин, И.С. Тартаковский, В.И. Кочеровец, **Н.М. Каргальцева**; Федерация Лабораторной Медицины, Комитет по микробиологии ФЛМ, утверждена ФЛМ 14.12.2021. – М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2022. – 84 с.

#### Рационализаторские предложения

1. Способ экспрессной диагностики состояния бактериемии у больных острым разлитым перитонитом. Рационализаторское предложение. Удостоверение № 182 от

20.09.2000 г. утверждено Проректором по НИР 29.09.2000 г. СПбГМА имени И.И. Мечникова / **Н.М. Каргальцева**, Х.А. Гамзатов, В.В. Федорова. – Санкт-Петербург, 2000.

2. Способ микроскопического исследования лейкоцитарного периферического крови как метод экспрессной диагностики бактериального менингита. Рационализаторское предложение. Удостоверение № 183 от 16.10.2000 г. утверждено Проректором по НИР 29.10.2000 г. СПбГМА имени И.И. Мечникова / М.А. Казади, **Н.М. Каргальцева**. – Санкт-Петербург, 2000.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

А/Г коэффициент	Альбумин/Глобулиновый коэффициент
ВГИК	Внегоспитальная инфекция кровотока
ВПС	Врожденные пороки сердца
ГИК	Госпитальная инфекция кровотока
ГКПМ-ОБОЛЕНСК	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов
ДИ	Доверительный интервал
ИБС	Ишемическая болезнь сердца
ИВ	Индекс встречаемости
ИК	Инфекция кровотока
ИЭ	Инфекционный эндокардит
К	Кандидемия
КАИК	Катетер-ассоциированная инфекция кровотока
КНС	Коагулазонегативный стафилококк
ЛНП	Лихорадка неясного происхождения
ЛПО	Лечебно-профилактическая организация
МПА	Мясо-пептонный агар
ППР	Прогноз положительного результата
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
СКС	Среда для контроля стерильности
СМА	Сердечно-мозговой агар
СМС	Сердечно-мозговая среда
СОЭ	Скорость оседания эритроцитов
СРБ	С-реактивный белок
УПМ	Условно-патогенный микроорганизм