

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

Чеботкевич Виталий Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» Федерального медико-биологического агентства России, лаборатория бактериологии, руководитель

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), целиолит, заболевания мочевыводящих путей до 30,9% (Velasco M. et at., 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 (Papamanoli 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 целиолите (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; Свишунов 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; Половухина 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 гемокультивирования 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 гемокультивирования 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 (Свишунов 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 молекуллярно-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 B. 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; Leitao 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 расширяют 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 объема 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 «освещения» (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.* 1KP-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/nuccore/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 маркёров 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-материалных 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 объёма 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 ГКБ №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 лейкослоя периферической 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 Данишука», г. Москва на исследование крови пациентов в СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 75» специализированную централизованную бактериологическую лабораторию

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 соблюдений 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% лимонно-кислого 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 высеив 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 Br 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® MS (bioMerieux, Франция) и анализатора микробиологического «BactoSCREEN».

Молекулярно-генетические методы исследования

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

Метод *16S rRNA* типирования проводили путём амплификации фрагментов гена *16S rRNA* в соответствии с опубликованными протоколами (Mathieu A. et all., 2013) и с использованием амплификатора «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле в 5% ТАЕ-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 вакутainerы, 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-) ($d / (c+d)$).

Биоинформационные 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. BXXR310F964808FA-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 χ^2 (хи-квадрат) Пирсона, при его неустойчивости использован точный критерий Фишера или χ^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 |
|--|--|------------------------------|
| Характеристика больных | | |
| Анамнестические данные | Сбор анамнеза и жалоб в разработанные анкеты | 1230 |
| Микроскопические исследования | | |
| Морфологические и тинкториальные свойства | Микроскопии лейкоцитарного слоя крови Микроскопии материала «кровь-среда» Осветление мазка | 2574 1594 33 |
| Бактериологические исследования | | |
| Получение гемокультуры и видовая идентификация микроорганизмов | Посев крови во флакон с жидкой средой Посев лейкоцитарного слоя на питательный агар с инкубированием в аэробных и анаэробных условиях Посев материала «кровь-среда» | 1594 962 4629 |
| Экспериментальные | Культивирование факультативно-анаэробных микроорганизмов в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях Посев крови на сахарный бульон, СКС и СМС Посев материала «кровь-среда» на 5% МПА и СМА с культивированием в аэробных условиях | 1275 780 600 |
| | Посев материала «кровь-среда» на 5% МПА и СМА с культивированием в анаэробных условиях | 600 |
| Масс-спектрометрические исследования | | |
| Идентификация микроорганизмов | Масс-спектрометрический | 300 |
| Молекулярно-генетические исследования | | |
| Индикация и идентификация микроорганизмов | Полимеразная цепная реакция Метод 16S rRNA типирования Nested-ПЦР Секвенирование 16S rRNA Полногеномное секвенирование | 157 157 26 157 1 |
| Клинико-лабораторные исследования | | |
| Гематологические | Определение количества эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, уровня СОЭ | 1914 |
| Биохимические | Определение уровней СРБ, фибриногена, общего белка, А/Г коэффициента, α_2 -глобулина, γ -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 оборудования.

вания, программного обеспечения для биоинформационического и статистического анализа 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 ротовоглотки 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: 7th ESCMID (Vienna, Austria, 1995); 2nd World Congress on Anaerobic Bacteria and Infections (Nice, France, 1998), 10th ECCMID (Stockholm, Sweden, 2000); 8-м съезде «Проблемы инфекции в клинической медицине» (Санкт-Петербург, 2002); 2nd ICCAID (Almaty, Kazakhstan, 2008); 23rd ECCMID (Berlin, Germany, 2013); конференции «Микробиология: от микроскопа до нанотехнологий» (Санкт-Петербург, 2013); 24th ECCMID (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-A6, 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 объема 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-

льное 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).

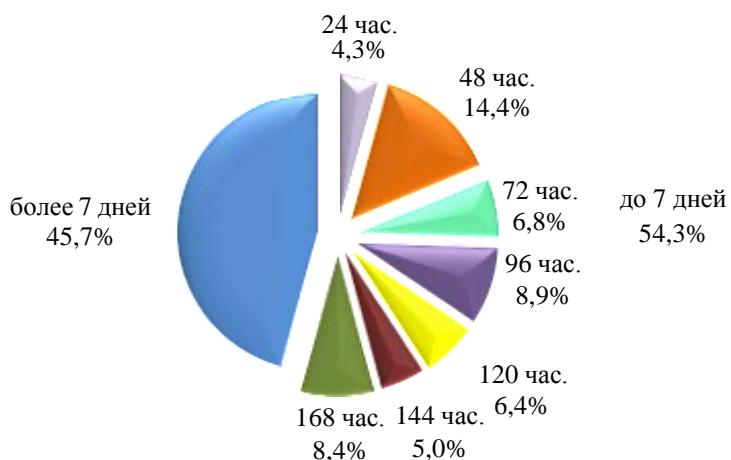


Рисунок 1 – Время получения гемокультур при ручном гемокультивировании

Контрольные высеи 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 субкультурирования 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 субкультурирование 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 субкультурирования.

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%.

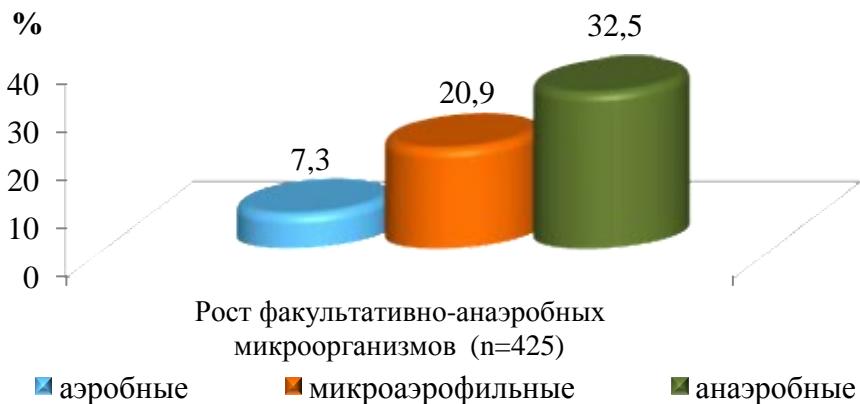


Рисунок 2 – Влияние газовых условий на рост факультативно-анаэробных микроорганизмов

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 +4⁰С. 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 +4⁰ С.

Приготовление жидкой сердечно-мозговой среды

Сухие ингредиенты среды растворяли в дистиллированной воде, кипятили 2–3 мин, добавляли стерильные мозговой и сердечный экстракти, раствор гемина и менадиона, доводили pH 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 +4⁰С (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-глютамин, 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 экстракти, гемин и доводили дистиллированной водой до объема в 1000 мл и pH 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 свежевыделенных 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).

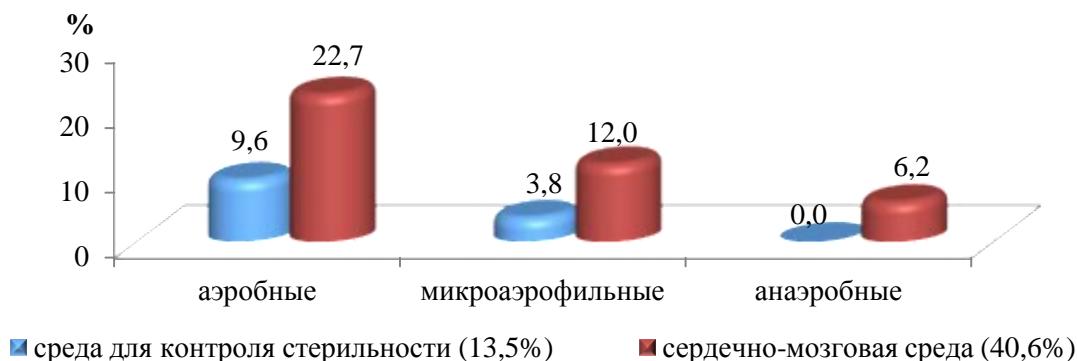


Рисунок 3 – Частота выделения микроорганизмов из крови на средах: СКС и жидкая СМС

Изучена эффективность ростаmono- 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.

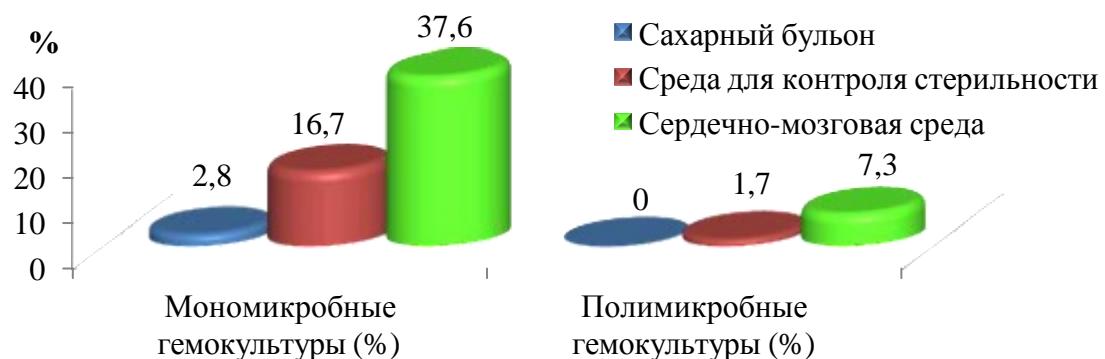


Рисунок 4 – Результаты получения мономикробных и полимикробных гемокультур на средах: сахарный бульон, СКС и жидкая СМС

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).

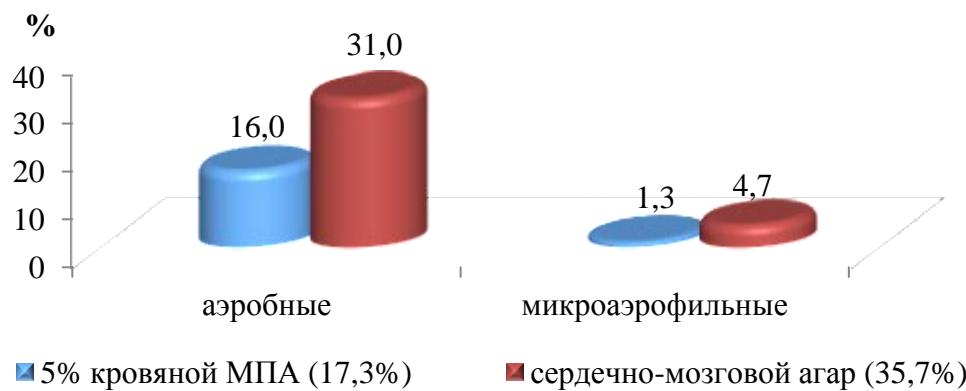


Рисунок 5 – Рост микроорганизмов при субкультивировании материала «кровь-среда» на 5% МПА и СМА в аэробных газовых условиях

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).

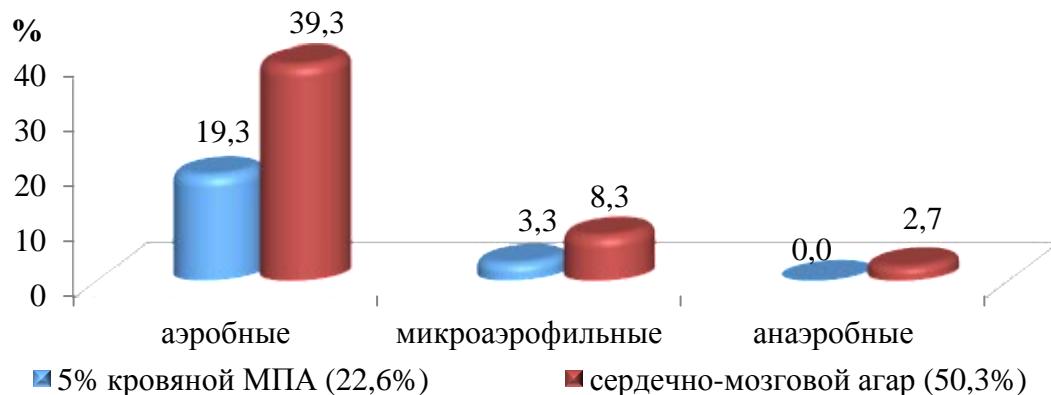


Рисунок 6 – Рост микроорганизмов при субкультивировании материала «кровь-среда» на 5% МПА и СМА в анаэробных газовых условиях

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.

Применили «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 наличие 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).

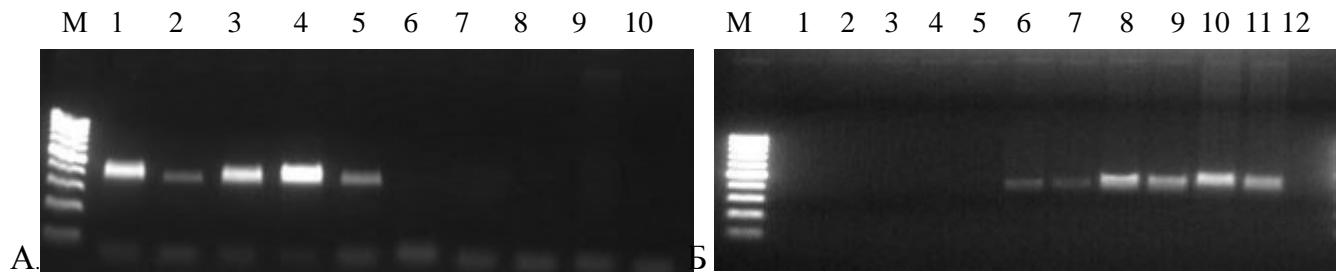


Рисунок 7 – Электрофореграмма результатов амплификации оптимизированной методики ПЦР для идентификации: А. Грам+ микроорганизмов (с праймерами DG74F - 143R); Б. Грам– микроорганизмов (с праймерами DG74F - 68dR)

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 использу-

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).

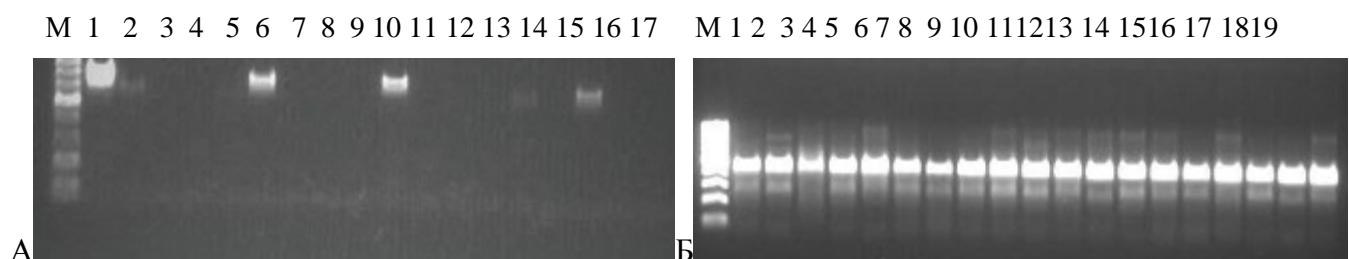


Рисунок 8 – Результаты постановки nested-ПЦР для индикации ДНК микроорганизмов из лейкоцитарного слоя (первый (А) и второй (Б) раунды)

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 наличие 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).

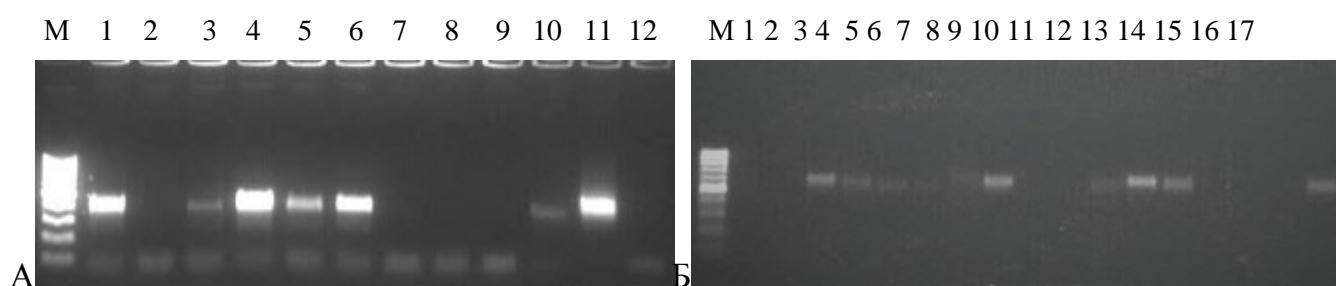


Рисунок 9 – Результаты постановки nested-ПЦР из лейкоцитарного слоя крови для идентификации ДНК Грам+ микроорганизмов с праймерами DG74F-143R (второй раунд) (А) и Грам- микроорганизмов с праймерами DG74F-68dR (второй раунд) (Б)

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 наличие 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.

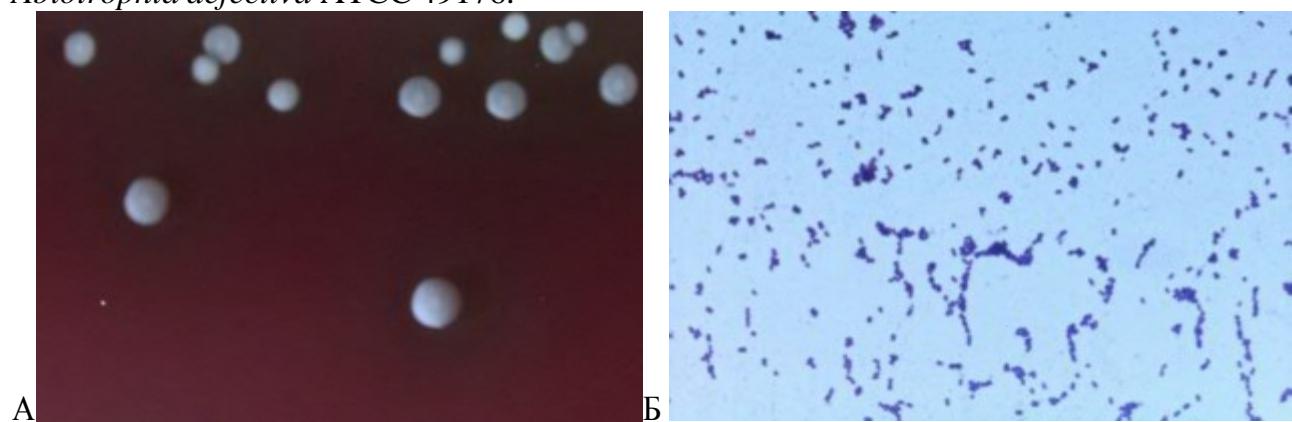


Рисунок 10 - Колонии и микроскопия мазка штамма *Aerococcus spp. 1KP-2016*

Примечание: А. рост на Columbia Agar Base (Conda, Испания) (Stereo Discovery, V12, Carl Zeiss Microscopy, GmbH; диапазон увеличений – 8× – 100×); Б. мазок по Граму (световой микроскоп Axio Scope A1 (объектив EC Plan-NEOFLUAR 100 x 1,3; окуляр PI 10 × 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 конкатенатированы. 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.urinaeaequi* (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.urinaeaequi* 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.urinaeaequi*, и представляет собой новый вид рода *Aerococcus*. Штамм *Aerococcus* spp._1KP-2016 депонирован в «ГКПМ-ОБОЛЕНСК» (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора).

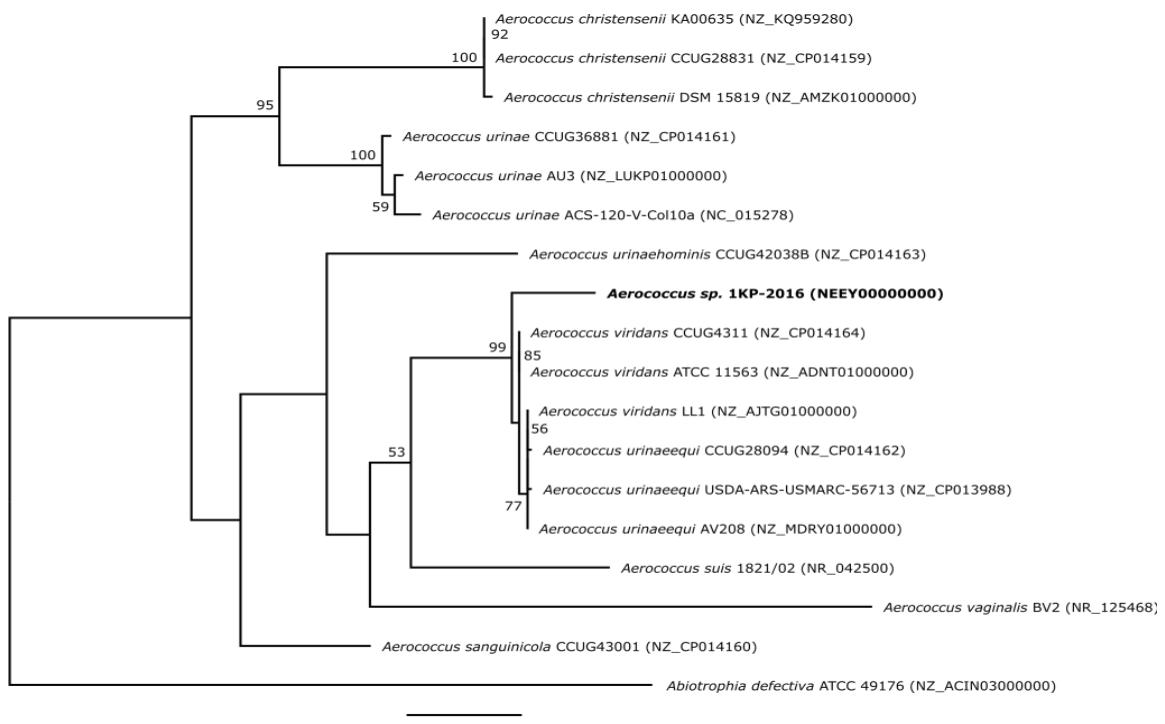


Рисунок 11 – Филогенетическое дерево последовательностей генов 16S rRNA

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. urinaeaequi</i> DSM 20341 | <i>A. urinaeaequi</i> CCUG28094 | <i>A. urinaeaequi</i> ARS-USMARC-56713 | <i>A. urinaeaequi</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. urinaeaequi</i> DSM 20341 | 76.49 | 95.21 | 92.88 | 92.89 | * | 100.00 | 98.27 | 95.44 |
| <i>A. urinaeaequi</i> CCUG28094 | 76.75 | 95.27 | 92.92 | 92.93 | 100.00 | * | 98.34 | 95.47 |
| <i>A. urinaeaequi</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 клинико-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, врождённые 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 ⁰) | УПМ*** (диагноз) | УПМ**** (очаги) | УПМ** (t ⁰) | 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 ⁰) | УПМ*** (диагноз) | УПМ**** (очаги) | УПМ** (t ⁰) | 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 анемнестические, клинические, клинико-лабораторные, микроскопические и бактериологические данные. Карта для внегоспитального пациента содержала анемнестические 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 |
| Аэробные микроорганизмы | 682 | 83,6 | 106,2 |
| Грамположительные кокки | 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.xylosus</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.mititis</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.raffinosus</i> | 1 | 0,1 | 0,2 |
| Грамположительные неспоровые палочки | 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.jeikeium</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 |
| грамм(+) 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 |
| Грамположительные споровые палочки | 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 |
| Грамотрицательные кокки и коккобактерии | 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 |
| Грамотрицательные палочки | 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.liliquefaciens</i> | 5 | 0,6 | 0,8 |
| <i>S.marinorubra*</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 |
| Анаэробные | 121 | 14,8 | 18,8 |
| Грамположительные кокки | 8 | 1,0 | 1,2 |
| <i>Peptococcus spp.</i> | 8 | 1,0 | 1,2 |
| Грамположительные палочки | 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 |
| Грамположительные споровые палочки | 4 | 0,5 | 0,6 |
| <i>C.formicaceticum</i> | 3 | 0,4 | 0,5 |
| <i>Clostridium spp.</i> | 1 | 0,1 | 0,2 |
| Грамотрицательные палочки | 3 | 0,4 | 0,5 |
| <i>Fusobacterium spp.</i> | 1 | 0,1 | 0,2 |
| <i>B.fragilis</i> | 2 | 0,2 | 0,3 |
| Грамотрицательные кокки | 3 | 0,4 | 0,5 |
| <i>V.parvula</i> | 3 | 0,4 | 0,5 |
| Грибы | 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 cepatia* (до 1993 г. *Pseudomonas cepatia*;******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 характеристики 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 |
| Всего, n (%) | 89 (63,6) | 43 (30,7) | 6 (4,3) |
| 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 |
| Аэробные микроорганизмы | 464 | 89,4 | 106,4 |
| Грамположительные кокки | 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 |
| Грамположительные палочки | 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.jeikeium</i> | 5 | 1,0 | 1,1 |
| <i>C.jeikeium</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 |
| Грамположительные споровые палочки | 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 |
| Грамотрицательные кокки и коккобактерии | 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 |
| Грамотрицательные палочки | 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.malophilia</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 |
|---|----|-----|------|
| Анаэробные микроорганизмы | 49 | 9,4 | 11,2 |
| Грамположительные кокки | 3 | 0,6 | 0,7 |
| <i>Peptococcus spp.</i> | 3 | 0,6 | 0,7 |
| Грамположительные палочки | 37 | 7,1 | 8,5 |
| <i>A.israelii</i> | 1 | 0,2 | 0,2 |
| <i>Cutibacterium acnes</i> **** | 36 | 6,9 | 8,3 |
| Грамположительные споровые палочки | 4 | 0,8 | 0,9 |
| <i>C.formicaceticum</i> | 3 | 0,6 | 0,7 |
| <i>Clostridium spp.</i> | 1 | 0,2 | 0,2 |
| Грамотрицательные палочки | 2 | 0,4 | 0,5 |
| <i>B.fragilis</i> | 2 | 0,4 | 0,5 |
| Грамотрицательные кокки | 3 | 0,6 | 0,7 |
| <i>V.parvula</i> | 3 | 0,6 | 0,7 |
| Грибы | 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) | | | |
| | 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 |
| Аэробные микроорганизмы | 218 | 73,4 | 105,8 |
| Грамположительные кокки | 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.xylosus</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.mitidis</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.raffinosus</i> | 1 | 0,3 | 0,5 |
| Грамположительные палочки | 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.jeikeium</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 |
| Грамположительные споровые палочки | 2 | 0,7 | 1,0 |
| <i>B.cereus</i> | 1 | 0,3 | 0,5 |
| <i>B.subtilis</i> | 1 | 0,3 | 0,5 |
| Грамотрицательные кокки и кокко-бактерии | 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 |
| Грамотрицательные палочки | 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 |
| Анаэробные микроорганизмы | 72 | 24,2 | 35,0 |
| Грамположительные кокки | 5 | 1,7 | 2,4 |
| <i>Peptococcus spp.</i> | 5 | 1,7 | 2,4 |
| Грамположительные палочки | 66 | 22,2 | 32,0 |
| <i>Bifidobacterium spp.</i> | 2 | 0,7 | 1,0 |
| <i>Cutibacterium acnes</i> ***** | 64 | 21,5 | 31,1 |
| Грамположительные споровые палочки | 0 | 0,0 | 0,0 |
| Грамотрицательные палочки | 1 | 0,3 | 0,5 |
| <i>Fusobacterium spp.</i> | 1 | 0,3 | 0,5 |
| Грамотрицательные кокки | 0 | 0,0 | 0,0 |
| Грибы | 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 marinorubra* (до 1980 г. *S.rubidaea*);*Klebsiella aerogenes* (до 2017 г. *K.mobilis*);****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*).

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 соо-

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 – грамотрицательные 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 K 7) и Axio Scope A1 (объектив EC Plan-NEOFLUAR 100x1,3; окуляр PI 10×23 Br foc, Carl Zeiss, Германия) (Рисунок 12).

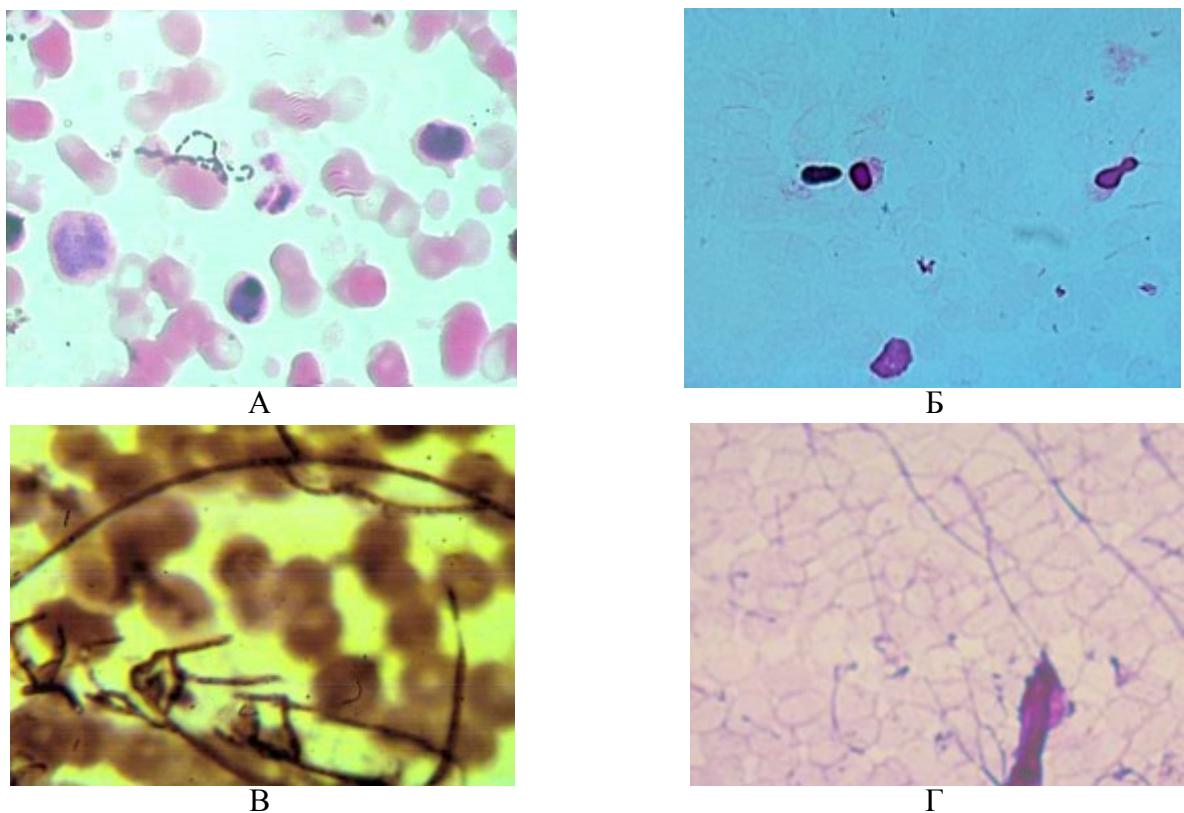


Рисунок 12 – Микрофотографии мазков лейкоцитарного слоя пробы крови (окрашивание по Граму)

Примечание: А – Цепочка грамположительных стрептококков; Б – Почкиющиеся 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 стекол-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 ≤ 10 относительный показатель представлен простой дробью, в числителе которой приведено абсолютное 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 антимикробное 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), γ -глобулина и α_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 γ -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 α_2 -глобулина.

Роль принципов культуромики 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-массспектрометрии 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 культуромики для исследования крови с целью повышения эффективности гемокультивирования. Инновационный подход на модели гемокультивирования и диагностики ИК включал разработку инструментов и использование следующих приемов культуромики: 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 молекуллярно-генетических методов для индикации и идентификации микроорганизмов в пробе крови, 13) применение MALDI-ToF-массспектрометрии.

Благодаря применению принципов микробиологической культуромики 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 мономикробных 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 молекуллярно-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. 1KP-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).

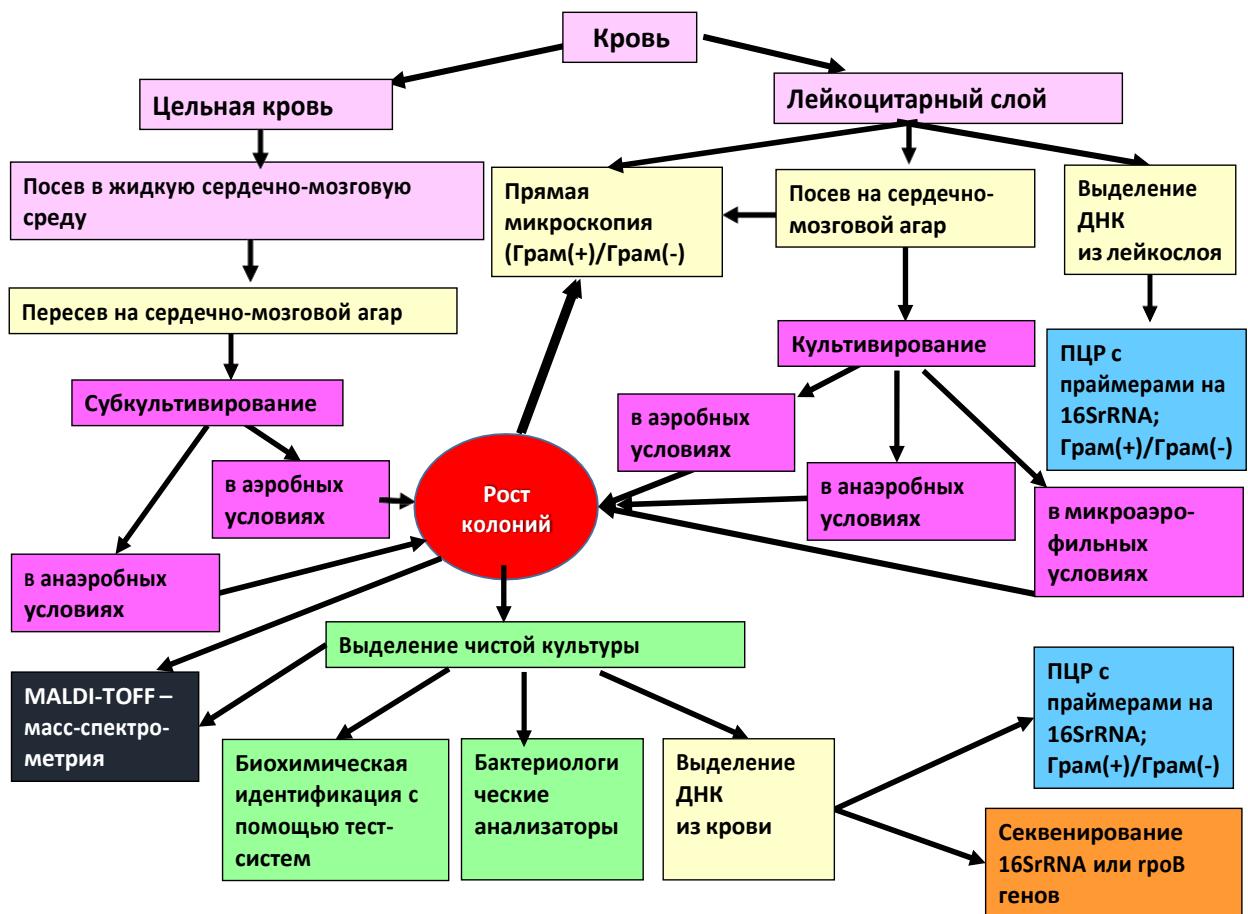


Рисунок 13 – Интегральный диагностический алгоритм при инфекции кровотока

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 «рассеява»;
- 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 натрием 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 лейкослоя 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 подтверждают ранние микробиологические находки в крови.

ВЫВОДЫ

1. С учетом современных принципов культуромики 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 культуромики, установили доминирующее положение грамположительных факультативно-анаэробных кокков, представленных преимущественно группой коагулазоотрицательных стафилокков, 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 микрорганизмы 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 кровоток, 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 мониторирования 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 bacteremia with peripheral blood smear in Infective Endocarditis / N. Kargaltseva // 7th 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 // 2nd 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: 10th 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 // 2nd ICCAID: Abstract book, Almaty, Kazakhstan, 27–30 March, 2008. – 2008. – № Р-134. – Р. 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 лейкослоя 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 // 23rd ECCMID: Abstract book, Berlin, Germany, 27-30 April, 2013. – 2013. – № R-2794. – С. 325.

19. **Kargaltseva, N.** Clinical signification of endogenous intoxication indexes at blood-stream infection / N. Kargaltseva, V. Kocherovets, A. Eliseev, M. Suvorova // 24th 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 GO1N 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 С1 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 С1 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 С1 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 лейкослоя периферической 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 |