

Федеральное бюджетное учреждение науки  
«Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и  
микробиологии им. Г.Н. Габричевского»  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека

*На правах рукописи*

КАРГАЛЬЦЕВА Наталья Михайловна

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

1.5.11 – микробиология

Диссертация  
на соискание учёной степени  
доктора медицинских наук

Научные консультанты:  
доктор медицинских наук, профессор  
Кочеровец Владимир Иванович  
доктор медицинских наук, профессор  
Борисова Ольга Юрьевна

Москва – 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
Актуальность темы исследования .....	7
Степень разработанности темы исследования .....	10
Цель исследования .....	11
Задачи исследования .....	11
Научная новизна.....	11
Теоретическая и практическая значимость работы.....	13
Методология и методы исследования.....	16
Материалы исследования .....	17
Пациенты.....	17
Штаммы микроорганизмов .....	18
Образцы клинического материала.....	19
Методы исследования .....	19
1. Микробиологические методы исследования.....	20
1.1. Микроскопический метод .....	20
1.1.1. Технические варианты приготовления мазков крови .....	20
1.1.2. Мазки из материала «кровь-среда».....	20
1.2. Бактериологические методы .....	21
1.2.1. Методики микробиологического исследования крови .....	21
1.2.2. Метод субкультивирования гемокультур.....	21
1.2.3. Идентификация выросших микроорганизмов .....	21
1.3. Молекулярно-генетические методы исследования .....	23
1.3.1. Выделение хромосомной ДНК из бактерий.....	23
1.3.2. Метод <i>16S rRNA</i> типирования .....	23
1.3.3. Детекция продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза.....	24
1.3.4. Секвенирование.....	24
2. Клинико-лабораторные методы исследования .....	24
3. Методы доказательной медицины в диагностике инфекции кровотока .....	25

4. Биоинформатические и статистические методы исследования .....	26
Личное участие автора в получении результатов .....	27
Основные положения, выносимые на защиту .....	28
Степень достоверности и апробация результатов исследования .....	29
ГЛАВА 1. Обзор литературы .....	31
1.1. Современные проблемы инфекции кровотока у терапевтических пациентов .....	31
1.1.1. Факторы риска возникновения и летальности при инфекции кровотока .....	32
1.1.2. Эпидемиологические варианты инфекции кровотока .....	36
1.2. Коморбидность, эмерджентные и жизнеугрожающие состояния при инфекции кровотока .....	42
1.3. Маркеры воспаления и другие сопутствующие диагностические характеристики при интегральной оценке инфекции кровотока .....	47
1.4. Современная культуромика – ренессанс классических культуральных методов и повышение эффективности клинико-лабораторной диагностики в терапевтической практике .....	53
1.4.1. Состояние и перспективы изучения гемокультуры .....	56
1.4.2. Лабораторные методы получения гемокультуры .....	61
1.4.3. Микробиологический спектр современных инфекций кровотока ...	68
1.4.4. Причины недостаточной информативности гемокультур. Контаминация при посеве крови .....	72
1.4.5. Интерпретация результатов гемокультивирования крови .....	72
1.5. Методы визуализации при микробиологическом исследовании крови .....	73
1.6. Молекулярно-генетические и масс-спектрометрические методы в диагностике инфекции кровотока .....	76
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	82
ГЛАВА 2. СОВРЕМЕННЫЕ ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ ИНФОРМАТИВНОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ КРОВОТОКА .....	82

2.1. Целевой сбор анамнеза у терапевтических пациентов .....	83
2.2. Методические особенности процедуры пробоподготовки в процессе получения гемокультуры.....	83
2.3. Вариативное культивирование проб крови.....	85
2.4. Нутриативные особенности микроорганизмов из числа вероятных участников бактериемий .....	88
2.4.1. Подготовительный этап в приготовлении сердечно-мозговых сред	90
2.4.2. Приготовление жидкой сердечно-мозговой среды .....	90
2.4.3. Приготовление сердечно-мозгового агара .....	92
2.4.4. Прикладные задачи в сфере лабораторно-производственной разработки и реализации целевых питательных сред.....	93
2.5. Оптимизация условий высокоэффективного процесса инкубирования исследуемых проб крови .....	97
2.6. Особенности скрининга потенциально положительных гемокультур у терапевтических больных .....	100
2.6.1. Пути повышения информативности методов визуализации микроорганизмов в диагностическом материале .....	103
2.7. Современные молекулярно-генетические методы в структуре комплексной диагностики инфекций кровотока .....	108
2.7.1. Оптимизация методики ПЦР при изучении чистых культур микроорганизмов .....	108
2.7.2. Разработка nested-ПЦР для целевой индикации и идентификации микроорганизмов в лейкоцитарном слое проб крови .....	113
2.8. Концептуальные принципы культуромики и их роль в повышении эффективности микробиологических исследований крови .....	119
2.9. Методика интегральной оценки диагностической значимости полученных гемокультур при изучении инфекций кровотока.....	121
<b>ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПРИ ИНФЕКЦИИ КРОВотоКА.....</b>	<b>129</b>
3.1. Характеристика обследованных пациентов терапевтического	

профиля.....	129
3.2. Клинические маркеры инфекции кровотока .....	131
3.2.1. Температурная реакция и озноб у пациентов, как сопутствующие скрининговые маркеры изучения гемокультур .....	131
3.2.2. Озноб – клинически значимый маркер .....	134
3.3. Другие маркеры риска инфекции кровотока .....	137
ГЛАВА 4. ВЕРИФИКАЦИЯ ИНФЕКЦИИ КРОВотоКА У ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ.....	144
4.1. Особенности инфекции кровотока у терапевтических пациентов..	144
4.1.1. Этиологический спектр инфекции кровотока госпитального (внутрибольничного) происхождения .....	152
4.1.2. Этиологический спектр инфекции кровотока внегоспитального (внебольничного) происхождения .....	160
4.1.3. Сопоставление особенностей госпитальной и внегоспитальной инфекций кровотока.....	168
4.1.4. Клинический пример выделения микроорганизма из крови.....	170
4.1.5. Визуализация инфекций кровотока у терапевтических больных...	172
ГЛАВА 5. ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ШТАММА <i>Aerococcus spp. IKP-2016</i> .....	178
ГЛАВА 6. ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ У ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ И ИХ ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРИ ИНФЕКЦИИ КРОВотоКА .....	182
6.1. Гематологические маркеры .....	182
6.2. Маркеры из числа сывороточных белков .....	196
6.3. Диагностическое значение гематологических показателей крови...	209
6.4. Диагностическое значение сывороточных белков крови.....	210
ГЛАВА 7. ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ АЛГОРИТМЫ И СИСТЕМА ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ КРОВотоКА .....	213
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	216

ВЫВОДЫ .....	226
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	228
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....	230
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	231
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	234
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	279

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Инфекция кровотока (ИК) осложняет, утяжеляет течение, ухудшает прогноз основного заболевания у терапевтических пациентов. Индикация микроорганизмов в крови является трудоёмкой проблемой микробиологической диагностики, требует совершенствования методов диагностики, применения молекулярно-генетических технологий, унификации методических и лабораторно-технологических подходов микробиологического исследования крови. Это позволит углубить научные знания по инфекции кровотока и расширить прикладное применение в отечественном практическом здравоохранении.

В мировой практике инфекция кровотока при терапевтической патологии характеризуется высокой летальностью (8–48%) [114, 270, 271, 309, 337], однако инфекцию кровотока не включили в международную классификацию болезней (МКБ-10, МКБ-11). В США пациенты с катетер-ассоциированной инфекцией кровотока (КАИК) имеют летальный исход в 16,9% случаев, в странах Европы – в 19–25% случаев. Бактериемия осложняет и является причиной летальности до 16% случаев у пациентов при диализе [157]. При инвазивных микозах у онкогематологических больных летальность составляет 20% [183]. При инфекционном эндокардите затруднена постановка этиологического диагноза в 14,3% случаев, допускаются диагностические ошибки в 84% случаев и получают отрицательную гемокультуру – в 31% случаев [193].

По данным ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, в 2018 году отмечался рост уровня заболеваемости госпитальными инфекциями. Число случаев инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), выросло на 17,9% по сравнению с 2017 годом. Зарегистрировано 502 случая инфекции кровотока с показателем заболеваемости 0,01 на 1000 госпитализированных пациентов по 52 субъектам РФ [2, 108]. В России при онкогематологических заболеваниях и иммунодефицитных состояниях уровень летальности при инфекции кровотока составляет 18–57% случаев [9, 84, 98, 104]. Генерализованная форма катетер-ассоциированной инфекции кровотока

составляет 63,2% с уровнем летальности до 18% случаев [50, 67]. Летальность при инфекционном эндокардите в России остается высокой (20–25%), заболевание течет атипично до 90% случаев [48]. Неблагоприятный исход инфекционного эндокардита и внегоспитальной пневмонии связывают с поздней и неэффективной диагностикой заболевания [49, 60, 83, 94]. Летальные исходы от инфекционного эндокардита на фоне лечения отмечены в 15–30% случаев, при отсутствии лечения – до 100% случаев.

Многие соматические заболевания имеют установленную микробную этиологию и патогенетическую связь с инфекцией, но микробиологическая диагностика крови не проводится. Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС) возникает в 30–40% случаев при циркуляции микроорганизмов в крови. Пародонтит способствует гематогенной диссеминации микроорганизмов в органы, ткани, клапаны сердца, суставы. Пневмония имеет летальные исходы до 10% случаев [34]. Микробиологическое исследование крови не проводится при заболеваниях стрептококковой этиологии (рожистое воспаление, фарингит, нефрит, некротический фасцит) [34], артритах [5, 13, 34], геморрагической лихорадке с почечным синдромом [34]. В нормативных документах ведения терапевтических больных отсутствует алгоритм по микробиологическому исследованию крови, соответственно, клиницисты не назначают данное исследование [53, 72].

В России в лечебно-профилактических организациях (ЛПО) по показаниям проводят микробиологическое исследование крови согласно Приказу № 535 от 1985 года [89], ряд медицинских центров и научно-исследовательских институтов федерального уровня используют импортные гемокультуральные автоматизированные системы. Средний показатель получения гемокультур, выполненных по регламенту Приказа № 535, составлял 20,0% [36, 47, 93, 109] и был выше среднего показателя положительных результатов гемокультивирования – 13,4%, выполненных на автоматизированных системах [4, 9, 32, 51, 84, 98, 106]. Низкая эффективность выделения гемокультур на импортных автоматизированных системах объясняется техническим нарушением в цикле



гемокультивирования, что связано с недостаточными знаниями работы с гемокультурой.

По исследованию крови в терапевтической практике отсутствуют актуальные нормативные документы по индикации и идентификации микроорганизмов, циркулирующих в кровотоке [30, 35, 47, 51, 69].

На современном этапе в диагностике инфекции кровотока при соматической патологии имеются следующие недостатки:

1. отсутствие на федеральном уровне актуальных нормативных и методических документов для лабораторий лечебно-профилактических организаций по диагностике инфекции кровотока у пациентов с терапевтическими заболеваниями;
2. профессиональная подготовка и переподготовка клиницистов и специалистов лабораторного профиля не предусматривает изучение маркеров и диагностики инфекции кровотока в терапевтической практике;
3. не разработаны альтернативные и экспресс-методы выделения гемокультуры, экспресс-методы диагностики инфекции кровотока, универсальный алгоритм исследования крови для пациентов терапевтического профиля;
4. отсутствует рецептура и промышленный выпуск отечественных сердечно-мозговых сред (СМС), как основных, для получения гемокультуры и выделения широкого спектра микроорганизмов из крови.

Высокие уровни летальности при инфекционных осложнениях терапевтических заболеваний являются следствием недостаточных знаний диагностики инфекции кровотока, имеющей особенности в получении гемокультуры, роли маркеров и факторов риска инфекции кровотока. Попытки усовершенствования техники получения гемокультуры, связанные с увеличением количества и объема проб крови, эмпирическим выбором питательной среды, не являются оптимальным решением проблемы. Применительно к принципам микробиологической культурологии необходимо оптимизировать процесс культивирования микроорганизмов в искусственных условиях роста возбудителей.

## **Степень разработанности темы исследования**

В России инфекцию кровотока изучают у больных с онкогематологическими заболеваниями [9, 32, 104, 109], при катетер-ассоциированной инфекции кровотока [54], послеоперационных осложнениях [4, 81], травмах [93]. Описаны попытки оптимизации алгоритма гемокультивирования [21], определения генов устойчивости в полимеразной цепной реакции (ПЦР) [22], техники глубинного и фракционного посевов крови [81], индикации микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции и электронной микроскопии [36, 52, 86]. Для получения гемокультур используют питательные среды, разработанные на основе панкреатического гидролизата каспийской кильки и казеина [79, 107].

В противоположность отечественному изучению инфекции кровотока, в странах Европы и Америки налажена система регистрации и мониторинга эпизодов инфекции кровотока, отслеживание эпидемиологической динамики случаев инфекции кровотока при любой патологии, включая терапевтическую, так диагностируют инфекцию кровотока при пневмонии [133, 145, 147], целлюлите [284], фарингите [113], пиелонефрите [231, колите [263]. За рубежом широко используются ручные и автоматизированные системы гемокультивирования [171, 177, 251, 323, 334], микроскопическое исследование крови [112, 126, 185, 196, 249, 262, 345] и технологии молекулярно-генетической диагностики возбудителей в крови [140, 185, 190, 199, 208, 306, 342].

Таким образом, существующие отечественные методики решают проблему диагностики инфекции кровотока недостаточно полно и, в то же время, при некоторых заболеваниях терапевтической патологии микробиологическое исследование крови не проводится. Используемая технология диагностики инфекции кровотока не является системной моделью, поэтому эффективность получения гемокультуры и верификация инфекции кровотока низкая, отсутствуют экспрессные модели индикации инфекции кровотока и выделения микроорганизмов из крови.

## **Цель исследования**

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

## **Задачи исследования**

1. Внедрить инновационные принципы микробиологической культуромики в процесс клинико-лабораторной диагностики инфекции кровотока у терапевтических пациентов.
2. На основе адаптированных схем и методов микробиологической культуромики повысить информативность этиологической диагностики бактериемий и других проявлений инфекции кровотока.
3. Провести сравнительное изучение и определить диагностическое значение микробиологических, масс-спектрометрических, молекулярно-генетических и других клинико-лабораторных маркёров при обследовании пациентов с признаками инфекции кровотока.
4. Разработать отечественные образцы высокопитательных сред с целью повышения эффективности методов культуромики при исследовании гемокультур.
5. Предложить современный алгоритм интегральной диагностики инфекций кровотока у терапевтических пациентов с учётом инновационных принципов микробиологической культуромики и сопутствующих маркёров клинико-лабораторного профиля применительно к практическим задачам лечебно-профилактических организаций Российской Федерации.

## **Научная новизна**

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

микробиологического исследования крови при любой патологии.

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

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

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

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

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

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

кровотока.

Впервые проведёно 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/nucore/NEEY00000000>).

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

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработанная универсальная модель получения гемокультуры и примененная информативная клиничко-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 о культивировании крови значительно расширяют практические возможности микробиологических лабораторий по выделению возбудителей из крови, дополняют представления клиничстов 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 госпитальных 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 молекулярно-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 грамтрицательных

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 осуществлять раннюю диагностику циркулирующих микроорганизмов в кровотоке, способствует практической оптимизации диагностики инфекции кровотока при минимальных технико-материальных и экономических затратах медицинских организаций.

Разработанный метод получения гемокультуры на основе прямого посева лейкоцитарного слоя пробы крови показал эффективную лабораторную диагностику инфекции кровотока при использовании небольшого объема крови и минимального количества проб, сокращения времени получения результата и отсутствии 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 здравоохранению Санкт-Петербурга, 2009 г.), «Микробиологические методы диагностики инфекции кровотока» (Комитет по

здравоохранению Санкт-Петербурга, 2-е издание, 2010 г.).

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

### **Методология и методы исследования**

Согласно поставленной цели исследования, анализа литературных данных и задач исследования конструировалось диссертационное исследование. Объектом исследования служили госпитальные больные кардиологического профиля и внегоспитальные терапевтические пациенты. Предметом исследования явились пробы цельной крови и лейкоцитарного слоя периферической крови. Работа многопланово решала проблему диагностики ИК, применяя микроскопические,



бактериологические, масс-спектрометрические и молекулярно-генетические методы исследования. Микроскопические исследования состояли из микроскопии мазка цельной крови, лейкоцитарного слоя крови и материала «кровь-среда». Бактериологические исследования крови включали посев цельной крови, лейкоцитарного слоя крови, материала «кровь-среда» с культивированием в разных газовых условиях с последующей идентификацией микроорганизмов с помощью биохимических тестов, коммерческих тест-систем, автоматизированной системы и масс-спектрометрических исследований. Молекулярно-генетические методы использовали для индикации и идентификации микроорганизмов. Анамнестические данные представлены симптоматическими, гендерными и возрастными характеристиками. Изучены гематологические и биохимические показатели воспаления в роли маркёров тяжести и прогноза инфекции кровотока.

Все исследования одобрены локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора (Протокол № 28 от 18 ноября 2014 г.).

## **Материалы исследования**

### **Пациенты**

В исследование 1985–2019 гг. включены пациенты, проходившие лечение в ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, и амбулаторные пациенты, направленные на исследование в СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 75» специализированную централизованную бактериологическую лабораторию и клинко-диагностический центр (КДЦ) ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора. Группа госпитальных больных сформирована на базе ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России совместно с врачами-кардиологами института: к.м.н. В. М. Козловой, Г. Д. Сапрыкиной. Группа внегоспитальных пациентов формировалась по мере поступления пациентов на обследование по направлениям клиницистов из лечебно-профилактических организаций (ЛПО): А. И. Сорокиной («Центр по лечению хирургических инфекций» СПб ГБУЗ городская больница № 5, г. Санкт-Петербург); А. В. Филатова, С. Н. Миролубова (Центр пластической хирургии ООО «Эскувер», г. Санкт-Петербург); Г. Б. Трошковой

(Стоматологический центр ЗАО «Иреко-Dental», г. Санкт-Петербург); д.м.н. В. Н. Хирманова (ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России, г. Санкт-Петербург); д.м.н. А. Т. Бурбелло (ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России, г. Санкт-Петербург); М. А. Эntenко (СПБ ГБУ Детская городская больница № 2 Святой Марии Магдалины, г. Санкт-Петербург); д.м.н. Е. И. Карповой, О. И. Данищук (Центр пластической хирургии ООО «Клиника Данищука», г. Москва); КДЦ ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора (г. Москва).

Общее количество (1230 чел.) обследованных больных с подозрением на эпизоды инфекции кровотока включало 848 госпитальных с кардиологическими диагнозами и 382 внегоспитальных пациентов с различными диагнозами по направлению клиницистов из медицинских организаций. Диагнозы больных представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Диагнозы терапевтических больных

Госпитальные		Внегоспитальные	
Диагноз	№ МКБ 10	Болезни систем организма	№ МКБ 10
Инфекционный эндокардит	I33	Органов дыхания	J40
Ревматизм	I07	Кожи и подкожной клетчатки	L30
Врожденный порок сердца	Q24.9	Мочеполовой	N20
Миокардит	I40	Полости рта	K05
Кардиомиопатия	I42	Осложнения после пластической хирургии	Y83
Ишемическая болезнь сердца	I21		
Лихорадка неясного происхождения	R50	Лихорадка неясного происхождения	R50

Госпитальные больные имели кардиологические заболевания, внегоспитальные – заболевания различных органов и систем организма (Таблица 1). Для сбора анамнеза, клинических симптомов и рисков развития ИК разработаны отдельно карты для госпитальных и внегоспитальных больных (Приложение 1). Анамнез 1230 больных заключался в сборе жалоб (повышенная температура тела, озноб), возрастных и гендерных данных. Роль клинико-лабораторных маркеров ИК оценивали по отклонениям гематологических и биохимических показателей крови.

### **Штаммы микроорганизмов**

В работе использовали коллекционные и свежесыведенные штаммы

микроорганизмов (Таблица 2, 3).

Таблица 2 – Коллекционные штаммы микроорганизмов

Вид микроорганизма	Коллекция
<i>Corynebacterium ulcerans</i> № 675 <i>Corynebacterium xerosis</i> № 1911 <i>Bordetella pertussis</i> № 143 <i>Bordetella bronchiseptica</i> № 9	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора
<i>Corynebacterium minutissimum</i> ATCC 23348 <i>Corynebacterium jeikeium</i> ATCC 43734 <i>Bordetella holmesii</i> ATCC 51541 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	American Type Culture Collection

Таблица 3 – Клинические штаммы микроорганизмов

№	Вид микроорганизма	Источник получения
1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Рабочая коллекция ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора
2.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
3.	<i>Staphylococcus hominis</i>	
4.	<i>Streptococcus mitis</i>	
5.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
6.	<i>Neisseria mucosa</i>	
7.	<i>Rothia mucilaginosa</i>	
8.	<i>Bacillus cereus</i>	

### Образцы клинического материала

Исследовано 2075 проб цельной крови и лейкоцитарного слоя периферической крови. Взятие крови и транспортировка производилась в процедурных кабинетах лечебно-профилактических организаций с соблюдением правил асептики и согласно правилам официальных документов [44, 82, 99]. У госпитальных больных кровь отбирали однократно, двукратно или более раз, у внегоспитальных – однократно или двукратно.

### Методы исследования

Выполненные исследования в количестве 19195 представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Выполненный объём исследований

Показатели	Методы	Количество исследований
<b>Характеристика больных</b>		
Анамнестические данные	Сбор анамнеза и жалоб в разработанные анкеты	1230
<b>Микроскопические исследования</b>		
Морфологические и тинкториальные свойства	Микроскопии лейкоцитарного слоя крови	2574
	Микроскопии материала «кровь-среда»	1594
	Осветление мазка	33

## Продолжение таблицы 4

<b>Масс-спектрометрические исследования</b>		
Идентификация микроорганизмов	MALDI-TOF MS	300
<b>Молекулярно-генетические исследования</b>		
Индикация и идентификация микроорганизмов	Полимеразная цепная реакция	157
	Nested-ПЦР	26
	Секвенирование <i>16S rRNA</i>	157
	Полногеномное секвенирование	1
<b>Клинико-лабораторные исследования</b>		
Гематологические	Определение количества эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, уровня СОЭ	1914
Биохимические	Определение уровней СРБ, фибриногена, общего белка, А/Г коэффициента, $\alpha_2$ -глобулина, $\gamma$ -глобулина	612

**1. Микробиологические методы исследования****1.1. Микроскопический метод****1.1.1. Технические варианты приготовления мазков крови**

В соответствии с Приказом № 535 от 1985 г. [89] готовили «толстый» мазок в виде капли крови. По одной капле из шприца помещали на предметные стекла, подсушивали на воздухе, фиксировали в смеси Никифорова, окрашивали метиленовым синим и по Граму (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Данную технику приготовления мазка мы обозначили как «капельная». Для приготовления двух мазков использовали 0,1–0,2 мл крови из шприца. По одной капле наносили на предметное стекло, другим стеклом распределяли по поверхности предметного стекла, высушивали, фиксировали, окрашивали по Граму (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Мазки микроскопировали при помощи микроскопа МИКРОМЕД-1, использовали иммерсионный объектив МИ 90–1,25 и окуляр К 7\* (ЛОМО, Россия), Axio Scope A1 (объектив EC Plan-NEOFLUAR 100 x 1,3; окуляр PI 10 x 23 Br foc, Carl Zeiss, Германия).

**1.1.2. Мазки из материала «кровь-среда»**

Для дальнейшего культивирования флаконов с видимым или без видимого роста микроорганизмов материал «кровь-среда» из флаконов отбирали для субкультивирования. Материал наносили на два предметных стекла, растирая петлей по форме овала диаметром около 1 см. Мазки высушивали, фиксировали,

окрашивали по Граму (ЗАО «ЭКОлаб», Россия).

## **1.2. Бактериологические методы**

### **1.2.1. Методики микробиологического исследования крови**

Посев цельной крови проводили согласно Приказу МЗ СССР № 535 от 1985 г. [89]; рекомендаций иностранных руководств ("Infective endocarditis: diagnosis, antimicrobial therapy and management, 2015 г.); методических рекомендаций «Принципы бактериологического исследования крови больных инфекционным эндокардитом» (Минздрав РСФСР, 1990 г.); и «Микробиологические методы диагностики инфекции кровотока» (Комитета по здравоохранению Санкт-Петербурга, 2010 г.). У госпитальных больных получали 10 мл крови шприцом, для посева использовали 1% сахарный бульон, «среду для контроля стерильности» и «двойную среду», приготовленные лабораторно. Выдерживали соотношение крови к среде как 1:10. Инкубировали 7–10 дней в аэробных условиях при температуре +37° С.

### **1.2.2. Метод субкультивирования гемокультур**

Согласно Приказу МЗ СССР № 535 от 1985 г. [89] при наличии признаков роста микроорганизмов во флаконе материал «кровь-среда» высевали на 5% кровяной (донорская кровь) мясо-пептонный агар (МПА) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), культивировали в аэробных условиях при температуре +37° С для получения чистой культуры с последующей идентификацией и определением устойчивости к антибиотикам. «Слепое» субкультивирование проводили на 10-й день культивирования флаконов без видимого роста микроорганизмов. Высев из флаконов проводили при помощи бактериологической петли из аэробного флакона. В случае отрицательных результатов микроскопии и отсутствия видимых признаков роста микроорганизмов выдавали отрицательный результат. Флаконы инкубировали до 6 недель, учитывая наличие медленно растущих микроорганизмов в пробе крови.

### **1.2.3. Идентификация выросших микроорганизмов**

#### *Идентификация микроорганизмов с помощью биохимических тест-систем*

Выросшие микроорганизмы изучали с использованием стереоскопических микроскопов МСП-1 (ЛОМО, Россия), SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss,

Германия), объектив PlanApo S 1,0× FWD 60 mm и окуляр PI 10 × 23 Br foc. Культуральные и морфологические свойства оценивали по характеру и размерам колоний, наличию гемолиза. Биохимические свойства определяли по выявлению ферментативной, сахаролитической и протеолитической активности с помощью биохимических тест-систем: набор реагентов «ДС-ДИФ-СТАФИ-16» (НПО «Диагностические системы», Н. Новгород), «СТАФИтест-16», «СТРЕПТОтест-16» (ERBA Lachema, Чехия) и на средах, приготовленных лабораторно по прописи Приказа МЗ СССР № 535 от 1985 г. [89].

#### Автоматизированные системы для идентификации микроорганизмов

Использовали бактериологический анализатор Auto SCAN-4 (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия).

Для видовой идентификации микроорганизмов использовали метод масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией / ионизацией (MALDI-ToF MS) при помощи VITEK<sup>®</sup> MS (bioMérieux, Франция) и анализатор микробиологический «VactoSCREEN», включающий в себя MALDI масс-спектрометр и программное обеспечение для управления анализом и идентификации микроорганизмов «VactoSCREEN-ID».

Для масс-спектрометрии культуру в пробирку типа эппендорф с 300 мкл деионизованной воды вносили бактериальную культуру (5 мкл), прогревали при +95°C в течение 25 мин, охлаждали, добавляли 900 мкл чистого этилового спирта, перемешивали и центрифугировали в течение 2 мин при 11300 g.. Удаляли надосадочную жидкость, подсушивали осадок, добавляли 25 мкл 70% муравьиной кислоты, перемешивали, инкубировали при комнатной температуре в течение 3 мин, добавляли 25 мкл N-ацетонитрила, перемешивали и центрифугировали в течение 2 мин при 11300 g.

Подготовленный образец наносили в лунку MSP-чипа и далее наносили 1 мкл матрицы. После высыхания матрицы MSP-чип помещали в прибор. Далее анализ проводился в автоматическом режиме.

### 1.3. Молекулярно-генетические методы исследования

#### 1.3.1. Выделение хромосомной ДНК из бактерий

Для выделения хромосомной ДНК культуру микроорганизма суспендировали в 150 мкл деионизованной воды, выдерживали 20 мин при +95°С, центрифугировали при 9600 g в течение 5 мин. Полученную ДНК хранили в замороженном виде при -20° С.

Для выделения ДНК получали суточную культуру микроорганизма, выращенную в 5 мл сердечно-мозгового бульона (ВНИ, «Conda С. А.» Pronadisa, Испания), с количеством клеток не менее 10<sup>9</sup> кл/мл. Полученную взвесь центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость, к осадку вносили 1,5 мл TES. Суспензию помещали в пробирку типа эппендорф, центрифугировали 5 мин при 15000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость. К осадку вносили 200 мкл смеси, состоящей из TES/сахарозы, лизоцима и мутанолизина, инкубировали 1 час при +42<sup>0</sup> С. Затем добавляли 3 мкл фермента РНК-азы, инкубировали 30 мин при +37<sup>0</sup> С, вносили 15 мкл фермента протеиназы К и инкубировали в термостате при +37<sup>0</sup> С 16 часов, далее вносили 800 мкл лизирующего раствора, перемешивали, инкубировали 10 мин при +60<sup>0</sup> С, центрифугировали 10 мин при 15000 об/мин. Далее пробу наносили по 500 мкл на колонку, предварительно центрифугируя в собирательной пробирке при 10000 об/мин в течение 1 мин, и удаляли проскок. Промывали колонку 2 раза по 500 мкл промывочным буфером. Удаляли проскок и еще раз центрифугировали для просушивания колонки. Переносили колонку в чистую пробирку типа эппендорф на 1,5 мл. Для элюирования ДНК использовали 50 мкл подогретого до +45<sup>0</sup> С ТЕ-буфера, который наносили на мембрану, выдерживали 2 мин при комнатной температуре, центрифугировали в собирательной пробирке (2 мл) при 10000 об/мин в течение 1 мин.

#### 1.3.2. Метод *16S rRNA* типирования

Метод применяли для идентификации выделенных из крови больных микроорганизмов путём амплификации фрагментов гена *16S rRNA* в соответствии с официальными протоколами.

Реакционная смесь для ПЦР включала: 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 200 mM каждого dNTPs (Thermo Fisher Scientific, Литва), по 0,1 мкМ прямого и 0,1 мкМ обратного праймеров (27F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 1492R 5'-ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT-3'), 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, Литва). Для амплификации использовали 1 мкл препарата ДНК и 25 мкл реакционной смеси. Амплификацию проводили на амплификаторе «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). Для положительного контроля амплификации использовали ДНК штамма *S. diphtheriae* биовара *gravis* № 665.

### **1.3.3. Детекция продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза**

Для детекции продуктов амплификации использовали метод горизонтального электрофореза в агарозном геле (Lonza, США), камеры SUB-CELL<sup>®</sup> GT (Bio-Rad Laboratories, США) и источник питания Power Supply Model 2002 / 2.0 (Bio-Rad Laboratories, США). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Литва).

К ПЦР-продуктам вносили: 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Литва) и 10 000x SYBR Green I (Lumiprobe GmbH, Германия). Смесь помещали в лунки 1,5% агарозного геля и подключали к электрическому току с напряжением в 160 V на период в 60 мин. Визуализацию результатов проводили с помощью гельдокументирующей системы Quantum-ST4-1100/26M (Vilber Lourmat, Франция).

### **1.3.4. Секвенирование**

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

## **2. Клинико-лабораторные методы исследования**

Взятие крови для клинико-лабораторных исследований осуществляли в процедурных кабинетах организаций согласно правилам официальных документов [26, 99].



К методам общего гематологического анализа отнесли подсчёт количества эритроцитов, лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, количества гемоглобина, скорость оседания эритроцитов (СОЭ). Анализы выполняли в ручном режиме и на гематологических анализаторах. Для ручного режима отбирали 3–5 мл крови, из которой часть использовали для определения СОЭ, часть – гемоглобина и из капли крови готовили мазок крови для подсчёта лейкоцитарной формулы. Для подсчёта клеток в анализаторе отбирали 150–300 мкл крови и отдельно 100 мкл для определения СОЭ. Клинический мазок крови выполняли при помощи шлифованного стекла техникой «двух стекол», окрашивали по Маю-Грюнвальду без предварительной фиксации, при микроскопии подсчитывали клетки крови. В гематологических анализаторах получали развернутую гемограмму [82].

Взятие крови для биохимических исследований проводили пункцией локтевой вены после тщательной обработки кожи 70% этиловым спиртом и 1% раствором йода. Использовали пробирки и вакутейнеры, содержащие различные варианты активаторов свертывания, стабилизирующие добавки для получения плазмы [26, 82].

### **3. Методы доказательной медицины в диагностике инфекции кровотока**

Доказательная медицинская диагностика является разделом доказательной медицины. Диагностический метод соответствует диагностике при определённом заболевании. Диагностический показатель способен математическим способом показать возможность возникновения заболевания и относится к диагностическим методам [3, 20].

Для оценки метода его результаты сводят в таблицу, называемую матрицей решений диагностики [2, 3, 58], и вводят операционные характеристики диагностических методов исследования. Для определения операционных характеристик составляют матрицу решений, которая основывается на исследовании группы пациентов, состоящей из больных и лиц без данной патологии. Строят 4-х-польную таблицу, вычисляют по формулам аналитические параметры диагностического теста. Матрица для вычисления операционных характеристик представлена в таблице 5. Данная таблица является основой для

вычислений. Ложноположительные и ложноотрицательные ошибки снижают диагностическую эффективность исследования [2, 3, 58, 77]. Термины и формулы представлены в таблице 6.

Таблица 5 – Матрица решений для вычислений операционных характеристик

Результаты теста	Заболевание		Всего
	имеется	отсутствует	
Положительный	a (истинно положительный)	b (ложноположительный)	положительных
Отрицательный	c (ложноотрицательный)	d (истинноотрицательный)	отрицательных
Всего	с заболеванием	без заболевания	всего

Таблица 6 – Термины диагностических исследований

Операционные характеристики	Формулы (%)
Se – Чувствительность	$a / (a+c)$
Sp – Специфичность	$d / (b+d)$
Ac – Точность	$(a+d) / (a+b+c+d)$
PPV – Прогноз положительного результата (ППР+)	$a / (a+b)$
NPV – Прогноз отрицательного результата (ПОР-)	$d / (c+d)$
P – Априорная вероятность заболевания	$(a+c) / (a+b+c+d)$
Частота ложноположительных результатов	$b / (b+d)$
Частота ложноотрицательных результатов	$c / (a+c)$
+Lr – Правдоподобность положительного результата	$a / (a+c) // b / (b+d)$
-Lr – Правдоподобность отрицательного результата	$c / (a+c) // d / (b+d)$
Отношение правдоподобия положительного результата	$a / (a+c) // (1-d) / (b+d)$
Отношение правдоподобия отрицательного результата	$(1-a) / (a+c) // d / (b+d)$
RR – Относительный риск	$a / (a+b) // c / (c+d)$

Как показано в таблице 6, по формулам определяют чувствительность, специфичность, точность, предтестовую и послетестовую вероятность заболевания. Специфичность предполагает долю здоровых лиц, у которых это исследование дает отрицательный результат. Повышение чувствительности сопровождается снижением специфичности. Точность – информативность диагностического теста. Прогноз положительного результата показывает вероятность наличия заболевания у больного и связан со специфичностью, прогноз негативного результата отражает вероятность отсутствия заболевания и связан с чувствительностью [2].

#### 4. Биоинформатические и статистические методы исследования

Программу PerlPrimer 1.1.21 использовали для подбора специфичных

олигонуклеотидных праймеров и программу Geneious 4.8.5. – для вычисления температуры их отжига. Проверяли специфичность праймеров с использованием программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Хроматограммы результатов секвенирования подвергали обработке с участием программы Geneious 4.8.5 для сопоставления с нуклеотидными последовательностями генов в международной базе данных EMBL / GenBank на сайте Национального центра биотехнологической информации США, NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Анализировали полногеномный сиквенс при помощи программы NCBI BLAST и программы автоматической аннотации генома RAST (<https://rast.nmpdr.org/>). Результаты электрофореза обрабатывали при помощи программы Quantity One (Bio-Rad, США).

Для статистической обработки полученных результатов применяли пакет программ для статистического анализа «STATISTICA», ver. 10 (StatSoft, Лиц. ВХХR310F964808FA-V). Распределения частот качественных показателей представлены точечной и интервальной оценкой в виде 95% доверительного интервала (ДИ), вычисляемого методом Вилсона (Wilson). Сравнительный анализ частот (долей) в группах исследования проведён с применением критерия  $\chi^2$  (хи-квадрат) Пирсона, при его неустойчивости (оцениваемой при анализе таблиц ожидаемых частот) использован точный критерий Фишера или  $\chi^2$  с поправкой Йетса. В качестве порогового уровня значимости нулевой статистической гипотезы принимали стандартное для медицинских исследований значение  $p=0,05$ . Для визуализации полученных результатов использованы графические средства пакета Microsoft Office.

### **Личное участие автора в получении результатов**

На основании анализа отечественных данных литературы автором определена основная идея исследования, разработаны задачи и методы для реализации поставленной цели. Автором выполнен весь объём микроскопии мазков крови и весь объём бактериологических исследований госпитальных больных, все микроскопические исследования крови внегоспитальных пациентов. 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 проведены совместно с сотрудником лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, к.м.н. А. В. Чаплиным; масс-спектрометрические исследования осуществляли 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 провели совместно с сотрудниками лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, с.н.с. к.м.н. Н. Т. Гадуа, с.н.с. к.м.н. А. С. Пименовой и с.н.с. к.м.н. И. А. Чагиной. Автор лично 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 культуромикрии, выявили доминирующее положение грамположительных факультативно-анаэробных кокков, представленных преимущественно группой коагулазоотрицательных стафилококков, из которых *S.epidermidis* составлял 74,0%.

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

Реализация поставленных задач основывалась на методологии микробиологической культуромикрии, как современного направления в микробиологической лабораторной диагностике. Достоверность полученных результатов получена за счет исследования 2075 проб крови и проведения 18501 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, программного обеспечения для биоинформатического и статистического анализов полученных данных.

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

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

Материалы диссертационной работы были доложены на 7<sup>th</sup> ESCMID (Vienna, Austria, 1995); 5<sup>th</sup> ESCID (Saint-Petersburg, Russia, 1997); 2<sup>nd</sup> World Congress on Anaerobic Bacteria and Infections (Nice, France, 1998), 10<sup>th</sup> ECCMID (Stockholm, Sweden, 2000); 8-м съезде «Проблемы инфекции в клинической медицине» (Санкт-Петербург, 2002); Всероссийской конференции хирургов (Тюмень, 2003); 2<sup>nd</sup> ICCAID (Almaty, Kazakhstan, 2008); 23<sup>rd</sup> ECCMID (Berlin, Germany, 2013); конференции «Микробиология: от микроскопа до нанотехнологий» (Санкт-Петербург, 2013); 24<sup>th</sup> ECCMID (Barcelona, Spain, 2014); 7-м конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2015); III-м микологическом форуме (Москва, 2015); II-м Национальном конгрессе бактериологов (Москва, 2016); IV-м съезде микологов (Москва, 2017); III-м Национальном конгрессе бактериологов (Москва, 2017); XXIV Кашкинские чтения, конгрессе по медицинской микологии и иммунологии (Санкт-Петербург, 2021); VI-м Национальном конгрессе бактериологов (Казань, 2021).

## ГЛАВА 1. Обзор литературы

### 1.1. Современные проблемы инфекции кровотока у терапевтических пациентов

В настоящее время наблюдаются изменения в патогенезе соматических заболеваний. Возрастает роль инфекции в этиологии соматических болезней. ИК осложняет терапевтические заболевания, повышает уровень летальности. В России инфекция в крови регистрируется как госпитальная инфекция (ГИ). В отчётах Роспотребнадзора ИК отсутствует и не включена в международную классификационную систему (МКБ-10, МКБ-11). Число случаев госпитальной инфекции кровотока (ГИК), внегоспитальной инфекции кровотока (ВГИК) и инфекции кровотока при оказании медицинской помощи (ОМПИК) растёт и сохраняется на высоком уровне во многих странах мира [48, 242, 266, 287, 337]. В мировой литературе имеются сообщения о патогенетической связи ИК с соматическими заболеваниями. При пневмонии риск ИК достигает до 9,6% случаев и летальность достигает 63,2% случаев [60, 83, 279]. Целлюлит часто ассоциирован с развитием ИК и риском летальности у пожилых людей до 14–37% случаев [150, 284, 348]. Периодонтиты являются причинами развития ИК в 42,5% случаев [73, 168]. Атопический дерматит характеризуется значительным количеством микроорганизмов в поражённом участке кожи ( $10^7$  КОЕ/см<sup>2</sup>) и провоцирует возникновение генерализованной инфекции в виде ИК. Острый фарингит у взрослых может осложниться ИК [113]. Описана бактериемия (Б) на фоне острого пиелонефрита [231, 359]. В отечественных рекомендациях по гастроэнтерологии не рассматривают развитие Б при тяжёлом течении колита [223, 263]. 10-дневную летальность при ВГИК связывают с хронической почечной недостаточностью [317]. Для развития ИК играют роль факторы риска: возраст, мультиморбидность, иммуносупрессия, инвазивные вмешательства, предшествующая антимикробная терапия [131, 136], которые присутствуют у терапевтических пациентов.

За последние 30 лет оценили клиническое значение гемокультуры, разработали формуляры питательных сред и гемокультуральные системы, отработали критерии интерпретации результатов, применили молекулярно-

генетические технологии диагностики [309, 365]. Внедрение современных методов исследования, новых лабораторных приемов не повысило диагностическую эффективность ИК, проблема остается сегодня одной из сложных и нуждается в кардинальном решении. Клиницисту требуются результаты в течение 6 часов для назначения лечения и снижения уровня летальности в силу поздней диагностики [295, 296].

Получение гемокультуры относится к сложной работе в клинической микробиологии. В 21 веке на микробиологические лаборатории возложена роль в оптимизации диагностики инфекционных заболеваний, включая ИК, глобальный эпидемиологический надзор за заболеваниями, ассоциированными с инфекцией [86, 182, 195].

### **1.1.1. Факторы риска возникновения и летальности при инфекции кровотока**

#### ***Факторы риска возникновения***

К факторам риска развития эпизодов Б в мире отнесён возраст: с 19 до 64 лет (43%), с 65 до 79 лет (28%), в Англии и Новой Зеландии – 65 лет [214, 242, 362, 364], при ВГИК – 57 лет, при ОМПИК – 53,7 лет, при ГИК – 47,3 года [340], отмечая по частоте случаев больше мужчин, чем женщин (54% и 46% соответственно) из-за курения и употребления алкоголя [192, 214, 242, 362, 364]. По материалам Центра Контроля и профилактики заболеваний в США (Centers for Disease Control and Prevention–CDC) пожилое население Америки увеличится к 2025–2030 гг. вдвое и будет составлять 20% всей популяции [369], уровень ИК у пожилых людей значительно возрастет. В Швейцарии выросло число случаев ИК на 14% и продолжает расти у пациентов старше 65 лет на 3% ежегодно [136]. В Норвегии частота эпизодов ИК увеличилась с 190 до 257 случаев на 100 000 человек-лет. Чаще эпизоды наблюдали у мужчин, чем у женщин и в возрасте старше 80 лет [271]. В Финляндии увеличилось количество эпизодов ИК на 40% во всех возрастных группах, особенно в группе старше 75 лет [95, 337].

Грамотрицательная ИК чаще развивается у пожилых пациентов и мочевые пути являются источником инфекции до 60% случаев [369]. В госпиталях Таиланда и Малазии у ВИЧ-инфицированных больных наблюдали *Mycobacterium tuberculosis*



Б. Высокий риск возникновения ИК у пациентов на хроническом гемодиализе, этиологическими агентами которого являются грамположительные кокки (68%), грамотрицательные палочки (22%), грибы *p. Candida*, редкие микроорганизмы: *Burkholderia cepaciae*, *Ochrobactrum anthropi* [143, 218, 349]. К прогностическим факторам риска возникновения ИК относят сопутствующую патологию (30%), опухоли, онкогематологические заболевания, которые способствуют развитию ГИК (24,6%), ВГИК (24,2%), ОМПИК (54,9%) [37, 214, 340].

КАИК возникает в 87% случаев среди первичных Б и при катетеризации центральных сосудов. КАИК лидирует как причина Б, занимает третье место среди всех ГИ и составляет 10% от всех инфекций у госпитальных больных [290, 293, 349]. В США 80 000 КАИК возникает ежегодно и составляет 15млн. катетер-дней. В США причинами госпитальной Б являются: центральный венозный катетер (72%), периферический венозный катетер (35%), артериальный катетер (16%), мочевого катетер (46%). Общая летальность составляет 27% случаев. КАИК в странах Европы составляет 60% от госпитальных Б и до 37% среди всех ГИ. Больные из стран Европейского Союза имеют выше уровень возникновения КАИК (1,55), чем больные из стран не Европейского Союза (0,33) на 1000 поступлений. В России ИК возникает при катетеризации в 26% случаев, уровень КАИК составляет 5,7 случаев на 1000 дней катетеризации [67]. Генерализация КАИК в России описана в 40,6% случаев продолжительностью до 13–16 дней из-за многочисленных инвазивных процедур, длительности нахождения катетеров и превосходит официальные данные ВОЗ по количеству генерализованных форм [17, 50, 361].

Назначение несоответствующей эмпирической терапии ведёт к развитию ИК с уровнем летальности в 21% случаев [120].

К факторам риска развития кандидозной ИК относят применение антибактериальных препаратов, кортикостероидов, химиотерапии, наличие онкологических заболеваний, нейтропении.

### ***Летальность при инфекции кровотока***

Число эпизодов и уровень летальности при ИК в мире растет в зависимости

от географии стран [162, 176, 222, 243, 283, 337]. В Европе ежегодно регистрируется ИК у 1,2 млн человек с летальным исходом от 8 до 48% случаев [165, 270, 309, 317]. В Финляндии увеличение эпизодов ГИК на 40% связывают с увеличением (33%) количества взятия образцов крови на гемокультуру и ростом резистентных к антибиотикам возбудителей ИК. К 2007 году число ИК увеличилось на 14,3% особенно у лиц 65 лет и старше и достигло 169 на 100 тыс. человек [337]. В этот же период уровень ИК в Дании составлял 153, в США – 190, в Англии – 189 на 100 тыс. человек [364]. В Норвегии ГИК связывают с *S. aureus*, с возрастом больных (74 года), с мужским полом (60,3%); летальность составляет 27,3% случаев [305]. В Юго-Восточной Австрии ГИК характеризовалась коагулазонегативными стафилококками, энтерококками, энтеробактериями, грибами *p.Candida* и летальностью в 21% случаев [250]. Частота возникновения ГИК по разным африканским странам различается в зависимости от географического расположения страны: наибольшая – в Западном и Центральном районах (12,4%), меньше – на Севере (10,3%), единичные – на Юге (9,8%) и Востоке (7,9%) Африки [315]. В Северном Вьетнаме ГИК и ВГИК регистрировались у больных в возрасте 48 лет (64,6%), среди которых 27,7% составляли женщины с уровнем летальности в 28,9% случаев. Возбудителями были: *K.pneumoniae* (17,5%), *E.coli* (17,3%), *S.aureus* (14,9%). Летальность связывали также с грамотрицательными палочками [161].

В США частота ГИК составляет 400 тыс. эпизодов в год с летальностью в США, Ирландии, Финляндии, Дании, Франции, Канаде составляет до 40% случаев [134, 271, 337]. В странах Африки уровень летальности – 18,1% случаев [315]. В России смертность от инфекционных заболеваний выросла к 2016 году на 8% [100]. ИСМП в России регистрируются от 25 до 30 тыс. случаев ежегодно [2]. В информационном бюллетене ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора за 2018 г. заболеваемость ГИ составляла 10% от всех пациентов в стационарах, число случаев ИСМП выросло на 17,9% случаев.

Летальность отличается по видам ИК: при ГИК она составляет 26%, ОМПИК – 19%, ВГИК – 16% случаев [228, 250]. Схожие уровни летальности описаны в

Корею: 23%, 18,4% и 10,2% случаев соответственно. По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в 2011 году в Европе 37000 смертей связаны напрямую с ОМПБК и 110000 – косвенно. В 62% случаях микроорганизмы выделяли после смерти пациентов: кишечная палочка (32%), пневмококк (17%), золотистый стафилококк (16%).

К факторам риска летальности относят лиц в возрасте 65 лет и старше, мужской пол, предшествующая сердечная и почечная недостаточности, инсульт, опухоли, низкий уровень сывороточного альбумина, уровень мочевины, гипотермия, наличие коморбидных заболеваний [255, 337]. В Финляндии среди больных возраста 25 лет летальность в 1,4 раза выше у лиц мужского пола, чем у девушек [337]. Среди мужчин старше 25 лет частота ИК повышалась с увеличением возраста и к 65 годам ИК случалась в 70% случаев.

В блоке интенсивной терапии (БИТ) стойкую гипертонию, сосудистые катетеры, повышенный уровень креатинина, парентеральное питание относят к факторам риска летальности, которая может достигать 80% случаев [329].

Катетеризация центральной линии кровотока провоцирует возникновение первичной ИК (4%), повышает частоту эпизодов КАИК (3–7%), риск летальности (53%), способствует повторным эпизодам ИК (7,1%). Частота КАИК в США и странах Европы достигает 19–25% случаев [50, 361]. В России генерализованная форма КАИК имеет летальность до 18% случаев [17, 50]. В Дании при катетеризации причинами ГИК были *S.aureus* и *E.coli* в 30% с летальностью до 16% случаев.

ИК у гемодиализных пациентов наблюдают в 13,7% случаев с летальностью в 16% и выделением *S.aureus* в 54,0% случаев [157].

Независимые факторы летальности имели больные с циррозом печени, онкогематологическими заболеваниями, перитонитом, трансплантацией органов, при возвратной Б и неадекватной антимикробной терапии [9, 121, 214, 309].

Под возвратным (повторным) эпизодом ИК определили выделение другого вида микроорганизма через 48 часов или выделение того же вида микроорганизма через 30 дней после первого эпизода. Средние уровни повторных Б составляли 2–

17% с летальностью 17–34% случаев [214]. Гемодиализ отнесли к фактору риска повторной *S.aureus* Б, которая возникала у 12,3% больных со средним возрастом в 48 лет и у мужчин (51,7%) с летальностью до 24,1% случаев. При единичном повторе Б летальность отмечали в 5,3% случаев, при множественных и через 5–15 месяцев – до 60% случаев. К факторам риска повторных эпизодов ИК относят: ГИ (2,1%), ОМПИК (2,4%), неадекватную антимикробную терапию (1,3%), заболевания желудочно-кишечного (2,3%), гепато-биллиарного трактов (2,0%), внутривенные катетеры (2,0%), эндокардит (2,7%) [200, 214].

Микробный фактор также влияет на летальность при ИК. Ведущим возбудителем при ВГИК является *E.coli*, при ГИК – грибы, при ГИК и ВГИК – пневмококки [340]. Летальность различается по видовому признаку микроорганизмов: при *Enterococcus spp.* достигает 31%, *P.aeruginosa* – 28%, *Enterobacter spp.* – 25%, *E.coli* – 14%, *S.aureus* – 16%, коагулазоотрицательных стафилококках – 13% случаев [134]. При грамотрицательной ИК антибиотикорезистентные палочки представляют риск летальности при первичной неадекватной до 38,4% и при адекватной терапии – до 27,4% случаев. Летальность при КАИК зависит от вида возбудителя: при коагулазоотрицательных стафилококках составляет 2–10%, *Candida spp.* – 38%, *S.aureus* – 8,2% случаев.

Эпизоды кандидозной ИК развиваются при: катетеризации (81%), хирургических операциях на желудочно-кишечном тракте (27%), онкогематологических заболеваниях (25%), опухолях (20%). Среди патогенов ГИК *Candida spp.* занимает 4-е место с летальностью до 40% случаев в США.

Анаэробная ИК характеризуется выделением *Bacteroides spp.* из крови в 96% случаев с летальностью до 25% случаев.

При ИК описана ранняя летальность (11–30%) и поздняя – спустя несколько лет после перенесенной ИК. Через 30 дней после ИК летальность отмечали у 15%, спустя один год – у 48%, 3 года – у 49%, 4 года – у 63% больных [246, 255].

### **1.1.2. Эпидемиологические варианты инфекции кровотока**

#### ***Источники инфекции кровотока***

Источники инфекции в организме являлись причинами возникновения ИК:

госпитальной (24%), внегоспитальной (45%), ИКОМП (31%) [203]. Среди источников инфекции чаще отмечали: респираторный (20%), гепатобилиарный (8%), желудочно-кишечный (13%), урогенитальный тракты (29%), внутрисосудистые приспособления (8%) [62, 203, 359]. Инфекция мочевых путей была источником ИК при внегоспитальной, госпитальной и ИКОМП (31,3%–58%, 28% и 14,2% соответственно), кишечная флора – (30,5%, 17,6% и 27,3% соответственно); пневмония – для госпитальной ИК (14,2%) [183, 327].

У кардиохирургических больных Б регистрировалась в первые дни после операции (80,4%) с высоким риском летальности (38,9%) и лидерством коагулазоотрицательных стафилококков (67,3%) [4].

Стоматологические вмешательства являются потенциальной причиной ИК. У здоровых людей Б случается при манипуляциях в полости рта. Одонтогенного происхождения Б появляется вслед за чисткой зубов обычной зубной щёткой спустя 5 минут в 61% случаев и через 15–30 минут или спустя 5–8 часов после любой манипуляции в полости рта [73, 205, 274].

### ***Эпидемиологические характеристики инфекции кровотока***

ГИК возникает спустя 48 часов после поступления в больницу, ВГИК – менее 48 часов до поступления в больницу. ОМПИК развивается у пациента вследствие оказания медицинской помощи в стационаре или иной организации здравоохранения, отсутствовала на момент обращения пациента за медицинской помощью и при госпитализации в течение 2-х или более дней [21, 340].

Во многих странах существует современная классификация ИК, 5 категорий: 1) истинная ВГИК (36%); 2) инфекция у пациента, недавно выписанного из больницы (11%); 3) инфекция, ассоциированная с инвазивными процедурами, выполненными до или во время госпитализации (4%); 4) инфекция у больных, поступивших из дома престарелых (7%); 5) ГИК (41%) [148]. Дополнительно ВГИК классифицировали на 3 группы по отличительным признакам: эпидемиологическим, клиническим, бактериологическим, включая устойчивость к антимикробным препаратам [148]. Другие исследователи классифицировали ВГИК на 4 большие группы (А, В, С, D) и дополнительно группу «С»

классифицировали ещё на 5 подгрупп (С1, С2, С3, С4, С5). Четыре группы ВГИК имеют чёткие различия в клинических признаках, характеристиках больных, источниках инфекции, по выделенным микроорганизмам и их чувствительности к антимикробным препаратам [242].

Эпидемиологически ИК классифицируют на ГИК, ВГИК и ОМПИК в зависимости от места, где ИК случилась и от факторов риска [21, 340]. В США определили доли всех эпизодов ИК: 56% случаев приходилось на ОМПИК, 29% – на ВГИК и 15% – на ГИК. Эпидемиологический анализ ИК в Норвегии показал в 58% случаев регистрацию ГИК и в 44% – ВГИК с преобладанием грамотрицательной флоры у женщин над грамположительной у мужчин (56,8% и 38,9% соответственно) [271]. Эпидемиологический анализ *S.aureus* ИК в Дании определил увеличение уровня ИК за счет роста ГИК на 29% и ВГИК на 71% случаев.

ГИК характеризуется частым инфицированием мужчин, характеризуется стафилококковой этиологией и катетер-ассоциированностью [340]. Для ГИК характерен возбудитель – *Acinetobacter baumannii* с летальностью до 27% случаев, с высокой устойчивостью во внешней среде и к антибиотикам [103].

Пациенты ВГИК имеют средний возраст в 71 год, мужчины составляют 67% и небольшое число сопутствующих коморбидных заболеваний. Иммунокомпромиссные пациенты составляют 31% случаев. ВГИК и ГИК отличаются по видам возбудителей и типу инфекции [250, 360]. Для ВГИК характерна инфекция мочевых путей (42%) и возбудитель – *E.coli* [152, 340]. В Австрии ВГИК характеризовалась выделением стрептококков [197]. ВГИК в странах с низким и средним экономическим развитием в 28% случаев характеризовалась высоким уровнем летальности (80%) и дисфункцией одного или нескольких органов [160]. В странах Юго и Юго-Восточной Азии (Тайланд) эпизоды ВГИК к 2010 году увеличились, летальность составляла 37,5% случаев, доминировали грамотрицательные палочки (70,7%), включая до 50,9% представителей сем. *Enterobacteriaceae*, грамположительные бактерии выделяли в 29,3% случаев [160, 161, 222]. Полимикробные ИК реже возникали при ВГИК [197].

В настоящее время ОМПИК является самостоятельной группой [242, 340], отличается по клиническим характеристикам от ВГИК [340], больше напоминает ГИК [340]. В Австралии ОМПИК случается у госпитальных (79%) и негоспитальных больных [335]. Патогенетическая связь возникновения ОМПИК с медицинскими манипуляциями показана после трахеальной (11,8%), оротрахеальной (12,0%), назотрахеальной интубаций (11,7%). Источниками инфекции для ОМПИК являются: внутрисосудистые катетеры (34%), нейтропенический сепсис (13%), инфицированный орган (35%) и патогены: коагулазонегативный стафилококк (18%), золотистый стафилококк (15%), кишечная палочка (11%), клебсиеллы (8%), энтерококки (7%) [335].

ИК, связанная с травмой, может развиваться в течение 96 часов (ранняя) в 29,7% и спустя 96 часов (поздняя) в 70,3% случаев после травмы. Этиологическими агентами чаще отмечали грамположительные кокки. Высокой степенью риска для поздней ИК являлись внутрисосудистые катетеры и механическая вентиляция более 7-ми дней.

После первичного эпизода Б в 9% случаев ожидали повторный (возвратный) эпизод, который случался в течение 3-х месяцев (59%) [115]. В среднем частота возвратных Б колебалась от 9% до 13% случаев и чаще наблюдали грамтрицательную Б [214], которая в 10% случаев повторялась два или более раз у мужчин в возрасте 69 лет с предшествующими заболеваниями. В 80% случаев источником являлся мочевой тракт и возбудителями – кишечная палочка и протей. В США повторную грамтрицательную ИК наблюдали спустя 1 год (6%), 5 лет (9%), 10 лет (15%) [115, 214]. В Канаде возвратные эпизоды Б имели место через 10 дней (11%), 30 дней (23%), 90 дней (59%), 180 дней (80%), 270 дней (90%) после возникновения первого эпизода. Фунгемия (Ф) повторно случалась в 6% случаев [214].

Б и Ф могут быть транзиторными и замедленными [73, 295]. Транзиторные Б и Ф соответствуют получению единичных положительных гемокультур [242]. Замедленная Б и Ф связана с большим количеством положительных гемокультур, взятых в разное время, например, при инфекционном эндокардите (ИЭ) [242].

Замедленную Б и Ф следует дифференцировать от постоянной Б и Ф, которая характеризуется положительными гемокультурами на фоне антимикробной терапии или антимикробной устойчивости циркулирующих патогенов [295].

Разные виды циркулирующих микроорганизмов в кровотоке при ИК у взрослых характеризуются малым количеством. При ИЭ отмечали от 1 до 30 КОЕ/мл микроорганизмов у больных стафилококковой и стрептококковой Б (54%). Результаты, полученные в лизис-центрифугирующей системе Isolator, показали менее 1 КОЕ/мл при *E.coli* (60%), грибов *p.Candida* (55%), *P.aeruginosa* (36%), *S.aureus* (25%) и более 10 КОЕ/мл в крови при *S.aureus* (53%), *P.aeruginosa* (36%), грибов *p.Candida* (36%), *E.coli* (23%). Количество циркулирующих микроорганизмов не всегда определяет клинику заболевания. Отсутствуют клинические симптомы при положительной гемокультуре с *S.epidermidis* в количестве менее 1 КОЕ/мл и при грамотрицательной Б в количестве менее 10 КОЕ/мл (77%). Больные умирали при количестве более 100 КОЕ/мл и не имели септического шока при 300 КОЕ/мл. При КАИК в количестве менее 10 КОЕ/мл отсутствовали осложнения, при – 100 КОЕ/мл имелись метастатические очаги инфекции. Установлено, что при катетеризации одновременно определяется разное количество грамотрицательных палочек в периферической вене (25 КОЕ/мл) и катетере (более 10000 КОЕ/мл). Летальность при грамотрицательной Б при количестве менее 5 КОЕ/мл составляла 50%, при более 5 КОЕ/мл – 84% случаев.

ИК случается до 21,8% случаев в хирургической практике, рана обсеменяется до 88,2% к концу гнойной операции. Микроорганизмы содержатся в лимфоузлах при гнойных хирургических заболеваниях (65%), плановых хирургических операциях хронических заболеваний (36,36%), опухолях (34,78%). Б возникает во время операции среднего уха с хроническим отитом, после тимпаноластики, септоластики, септоринопластики, сопровождается повреждение глаз в 12% случаев.

ИК при ревматизме характеризуется выделением грамотрицательной и анаэробной микрофлоры, микробных ассоциаций, что отражает дефекты иммунологического статуса пациентов.

Частота обнаружения стафилококка при ИЭ – от 15 до 56% случаев. Процесс



сопровождается развитием гнойных осложнений (14,3%) в виде эмболий и инфарктов (57,1%). Коагулазонегативные штаммы стафилококка и *S.lugdunensis* являются возбудителями ИЭ естественных и искусственных клапанов сердца, имплантированного кардиодефибриллятора, абсцессов мягких тканей [232]. Грамотрицательный ИЭ диагностируется у 3–8% больных и чаще относится к вторичному эндокардиту, развивается на протезированном клапане сердца. К потенциальным возбудителям вторичного ИЭ относят: *E.coli* (31%), *P.aeruginosa* (19%), *K.pneumoniae* (10,3%), палочки семейства *Enterobacteriaceae* (58,6%), энтерококки (17,8%) При ИЭ выделяют ассоциации с аэробными микроорганизмами до 6% случаев [179].

У больных онкогематологическими заболеваниями Б отмечали в 8% и Ф – до 38% случаев. Грамотрицательные бактерии были ведущей этиологической причиной в 74% случаев, включая лидерство *E.coli* (42,3%) с летальностью до 22% случаев [37, 188, 212, 277].

При ИК у больных нейтропенией выделяли грамположительные кокки (50,1%) с доминированием *Streptococcus* группы *viridians* (23,4%), грамотрицательные палочки (45,6%) с преобладанием *E.coli* (15,3%), грибы (93,5%) и полимикробные гемокультуры (11,3%) [141].

В настоящее время частота бактериально-грибковой полимикробной ИК достигает 22% случаев. При симбиозе грибов *p.Candida* с *S.aureus* патогенная способность грибов усиливается в 2 раза за счет бактериального экстракта, который стимулирует адгезивную способность гриба [57]. При полимиозите, полирадикулоневрите описаны ИК с выделением ассоциации *S.epidermidis* и *C.minutissimum*.

Оценка контаминации посева крови сложная. Положительные результаты посева крови в течение 2-х дней часто расценивают кожной, в течение 6 дней – лабораторной контаминацией. Дифтероиды считают контаминантами при концентрации их в крови менее 1 КОЕ/мл и без наличия клинических симптомов. Выделение *Cutibacterium acnes* в течение 4-х дней при количестве от 0,1 до 17,2 КОЕ/мл диагноз септицемии не ставят.

## 1.2. Коморбидность, эмерджентные и жизнеугрожающие состояния при инфекции кровотока

Инфекция кровотока возникает как осложнение и как самостоятельная патология в терапевтической практике.

### *Соматические заболевания*

ИЭ – терапевтическое заболевание инфекционной природы возникает в результате инвазии в эндокард циркулирующих в кровотоке микроорганизмов, которые адгезируются на стенке клапана, колонизируют и формируют вегетации. Морфологические изменения клапанного аппарата меняют сердечную гемодинамику, увеличивают риск трансформации Б в ИЭ до 91,9% [326]. Диагноз ИЭ ставят на основании получения положительной гемокультуры, при перикардите и миокардите посев крови не делают [124]. В настоящее время изменения клинической картины ИЭ привели к расхождению диагноза до 30,2% случаев [48]. В этиологии ИЭ лидирует золотистый стафилококк (31,2%), зеленящий стрептококк (17%), энтерококки (10%), грамотрицательные бактерии (17,1%), грамотрицательные анаэробные палочки [48]. Имеются публикации получения гемокультур у терапевтических больных: кардиологических (17%), пульмонологических (5%), ЛОР-отделения (2%), гематологических (26%), неврологических (26%), инфекционных (17%). В 21% источник инфекции не был найден [32, 33].

В списке соматических заболеваний, при которых часто развивается ИК и получают гемокультуру (15,8%), стоят онкогематологические заболевания, ВИЧ-инфекция, опухоли [9, 203, 264]. Динамика ведущих возбудителей за период 2005-2012 годов показала снижение лидерства *S.aureus* и *E.coli* и рост коагулазонегативных стафилококков, энтерококков, клебсиелл [9]. При гемобластозе гемокультуру получали в 10,4% случаев с преобладанием грамположительных бактерий (91%), среди которых лидировал *S.epidermidis* (71,3%) [109]. Данному заболеванию сопутствовали вирусы (цитомегаловирус, Эпштейн-Барра) и микромицеты, высокий уровень летальности [109]. При дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) описаны случаи Б, но в патогенезе ведущей инфекцией

считают вирусы [330]. Ишемическая болезнь сердца (ИБС), атеросклероз, очаги инфекции, медицинские манипуляции, функциональная недостаточность макрофагов вместе с циркуляцией бактерий в кровотоке являются предрасполагающим фоном для развития ИК [90]. Циркулирующие в крови бактериальные субстанции влияют на центральную гемодинамику. При патологии сердечной деятельности ИК усугубляет развитие сердечной недостаточности, вызывает нарушение ритма сердца. Фосфолипазы бактерий гидролизуют фосфатидилхолин клеточных мембран с образованием лизофосфатидилхолина, обладающего аритмогенной активностью. Патогенное действие анаэробной микрофлоры в крови у больных с фибрилляцией желудочков связано с тканевой продукцией перекиси водорода, в присутствии которой усугубляется аритмогенный эффект фосфолипаз [370].

### ***Коморбидные заболевания***

По терминологии к коморбидным и мультиморбидным заболеваниям относят сопутствующие заболевания или состояния. Пожилые люди возраста 80 лет имеют одновременно мультиморбидные заболевания до 80% случаев [15, 18]. Сопутствующие заболевания влияют на лечение, исход основной патологии [14]. Коморбидные состояния количественно сгруппированы в 5 категорий с нумерацией: «нулевая» (нет состояний), «начальная» (1–3), «промежуточная» (4–6), «расширенная» (7–9), «сложная» (более 10) [217]. Медицинская помощь больным с хроническими коморбидными состояниями стоит в 7 раз дороже помощи больному с одним хроническим заболеванием. При диагностике ИК следует учитывать возраст и количество коморбидных состояний [217]. В Дании в изучение ИК включили сопутствующие коморбидные заболевания в факторы риска. К неблагоприятным факторам прогноза при ИК отнесли полимикробную Б (2,7%), Ф (2,2%), высокий индекс коморбидности (1,7%) [6, 74].

Коморбидные инфекции (КИ) в настоящее время актуальны для ревматологии. При аутоиммунном ревматическом заболевании возникают КИ различной этиологии, что приводит к увеличению летальности. КИ чаще развиваются у стационарных больных (38,1%) [358]. К числу КИ отнесли

остеомиелит, инфекцию кожи и мягких тканей, пневмонию, сердечно-сосудистые заболевания, диабет.

### **Эмерджентные заболевания**

Термин «эмерджентность» обозначает, что система обладает новыми свойствами, не характерными для элементов, составляющих эту систему. Новые «возвращающиеся» болезни получили название эмерджентных. Они существовали ранее, в настоящее время увеличилось число случаев их появления. Большинство из них – природно-очаговые заболевания. Эффективная лабораторная диагностика позволила выявлять ранее неизвестные возбудители инфекции. В настоящее время насчитывается более 100 нозоформ различной этиологии [64]. Инфекционные болезни имеют свойство изменяться в течение многих лет, но остаются ведущей причиной смертности. Изучение появления новых и возвращение старых инфекций позволяет понять эволюционные свойства патогенных микроорганизмов, взаимодействие между собой, с организмом хозяина и с внешней средой [278]. В России эмерджентные заболевания представлены природно-очаговыми и по степени появления делят на: 1) вновь возникшие, 2) вновь выявленные, 3) намеренно внедренные. К актуальным заболеваниям относят: гранулоцитарный анаплазмоз, моноцитарный эрлихиоз, бабезиозы, астраханская риккетсиозная лихорадка, иксодовые боррелиозы [63]. Эти инфекции представляют угрозу для людей с пониженным иммунитетом. Ассоциация возбудителей, необычное течение заболевания предрасполагают для возникновения эмерджентной инфекции. Придали статус эмерджентной ГИК в двух госпиталях, вызванные грамотрицательной палочкой и передающиеся через воду (*Elizabethkingia meningoseptica*), которые характеризовались летальностью от 33% до 50% случаев [205, 307, 319]. *Shewanella putrefaciens* и *Shewanella algae* – грамотрицательные неферментирующие палочки, распространенные во внешней среде, были представлены эмерджентными возбудителями оппортунистической Б [297]. К «возвращающимся» микозам отнесли кандидозы [75]. Сапрофитные дрожжи *p.Rhodotorula* отнесли к эмерджентным возбудителям ИК после 1985 года, когда описали их как патогенные для человека [363]. В настоящее время зарегистрировано

до 2,3% ИК с этим возбудителем в США и Европе [172]. Большинство случаев связывают с применением центрального венозного катетера и онкогематологическими заболеваниями [363].

### ***COVID-19 и инфекция кровотока***

COVID-19 – тяжелое вирусное заболевание, имеет тенденцию осложняться бактериальной и грибковой инфекциями, среди которых чаще отмечают пневмонии (10% – 33%) и вторичные ИК (ВИК) (2% – 6%) [111, 338]. По данным Schad V.A. (2021 г.) среди 774 госпитализированных больных с COVID-19 1/3 больных нуждалась в механической вентиляции легких. У интубированных пациентов в 27% случаев выделили *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *Klebsiella spp.* из отделяемого респираторного тракта и 2% неинтубированных больных имели пневмонию, ассоциированную с этой вентиляцией. В 5% случаев развивалась ВИК, среди которых 50% больных умирали. Автор пришла к выводу, что интубация (66,7%) и катетеризация центральной вены (47,2%) относятся к факторам риска развития ко-инфекции. Ведущими источниками считают – легкие, центральный венозный катетер (30,1%), механическую вентиляцию (14%), неизвестные факторы (47,8%–55,9%) [111, 117, 130, 137, 216]. Одним из факторов риска развития ко-инфекции авторы рассматривают поступление больного с COVID-19 в БИТ. 20% больных с COVID-19 инфекцией нуждаются в поступлении в БИТ в силу острого респираторного дистресс-синдрома. В отделении БИТ у больных с COVID-19 до 57,7%–67,4% случаев развиваются эпизоды ВИК через 10 дней [130, 189]. При сравнении ковидных больных, находящихся в отделении БИТ, ВИК случалась чаще у них (14,9%), чем у больных без COVID-19 инфекции (3,4%) [137]. Риск развития ВИК у больного с коронавирусным заболеванием связан со временем нахождения в отделении БИТ (7–12 дней). В случае пребывания в отделении БИТ 15 дней ВИК развивается в 25% и 30 дней – в 50% случаев [137, 189, 338]. Факторами риска развития бактериальной и грибковой ко-инфекции являются: хроническое обструктивное заболевание легких, предшествующие хронические бактериальные инфекции, применение механической вентиляции, медицинские процедуры, инвазивные техники [117, 153]. Из больных с COVID-19 инфекцией 25,3% поступают в отделение БИТ, чаще мужчины (77,5%)

среднего возраста (61,5–66 лет) и пациенты, нуждающиеся в механической вентиляции легких (82,9–93,3%), где возникает бактериальная и грибковая инфекция (36,6%) и летальный исход достигает 10,5%–49,4% случаев [111, 130, 189, 338].

Имеется мало сообщений о госпитальной и внегоспитальной бактериальной инфекции у больных с тяжелым острым респираторным синдромом SARS-CoV-2 инфекции. Ранняя бактериальная инфекция диагностируется у 2–3% больных. Поздняя бактериальная инфекция чаще случается и 1/3 таких больных поступает в БИТ, где развивается вентиляционно-ассоциированная инфекция. При внегоспитальной бактериальной инфекции выделяли наиболее часто: *S.pneumoniae*, *S.aureus*, при госпитальной – грамотрицательные палочки неферментирующие и сем. *Enterobacteriaceae*.

При исследовании крови больных с COVID-19 в 91,4% случаев получали положительные бактериальные и в 5,5% – грибковые гемокультуры. Спектр возбудителей представлен: *S.epidermidis* (24%), *S.aureus* (13%), *E.faecalis* (18%), *viridians Streptococcus spp.* (7%), *E.aerogenes* (9%), *E.coli*, *C.albicans* (7%), *C.glabrata*, *Sporothrix schenckii* [127, 137, 142, 189]. В Бельгии и в США *F.nucleatum* неоднократно выделяли из крови у больных с коронавирусом заболеванием и заключили, что анаэробные микроорганизмы необходимо рассматривать как патогены осложнений при COVID-19 [367, 142]. В Англии отметили низкую частоту (7,1%) бактериальной ко-инфекции, подтвержденной микробиологически [201]. Ведущими патогенами у больных с COVID-19 в отделении БИТ были грамположительные микроорганизмы (72,6%), среди которых *Enterococcus spp.* (45,3%), коагулазонегативные стафилококки (20,5%), *S.aureus* (7,6%), грамотрицательные палочки (24,8%), грибы *p.Candida* (2,6%). Мономикробную ВИК регистрировали в 76,3% и возвратную – в 20,4% случаев [130]. Госпитализированные с COVID-19 и ВИК имели летальность в 53,1% случаев [127]. В Англии определяют возбудитель ВИК до поступления в отделение БИТ и назначают комплекс антибиотиков из амоксиклава и макролидов [153].

Вторичные бактериальные и грибковые инфекции ассоциированы с факторами риска оказания медицинской помощи, предшествующими

медицинскими манипуляциями и нахождением в БИТ. Более 66,7% случаев ВИК приходится на больных, находящихся в отделении БИТ [111]. Рекомендуют диагностировать госпитальные бактериальные и инвазивные грибковые инфекции как можно раньше, до поступления в БИТ [117].

### **1.3. Маркеры воспаления и другие сопутствующие диагностические характеристики при интегральной оценке инфекции кровотока**

Получение гемокультуры верифицирует ИК, в случае отрицательных результатов диагноз ИК ставят по анамнестическим, клиническим и лабораторным данным [155, 160, 242, 267]. К ним относят: возраст (более 30 лет), сердечный пульс (более 90 ударов в минуту), температура тела (выше 37,8° С), наличие центрального венозного катетера, продолжительность госпитализации (более 10 дней) [271, 337]. Для диагностики ИК имеет значение клинический синдром. Повышение температуры тела и гипотермическое состояние относят к прогностическому синдрому у больных с Б. В случае отсутствия установленного возбудителя, но при наличии лихорадки, ВОЗ применил термин «лихорадка неясного генеза» (ЛНГ), в МКБ-10 она обозначена как «лихорадка неясного происхождения (ЛНП)». Самой частой жалобой внебольничных пациентов является повышенная температура тела в сочетании с клиническими проявлениями: дерматиты, респираторные симптомы, проблемы ЛОР-органов, нарушения со стороны кишечника, суставные, кардиальные, урогенитальные, неврологические, гематологические проблемы. ИК вызывает изменения в показателях клинического анализа крови. При гнойно-воспалительной патологии имеет место «анемия при хронических заболеваниях». Гематологическими симптомами инфекции являются нейтрофильный лейкоцитоз с моноцитозом, лейкопения, моноцитоз, эозинопению, эозинофилия, повышенное СОЭ.

#### ***Характеристики маркеров воспаления***

Воспаление характеризуется появлением ряда белков, получивших название «белки острой фазы» или «острофазовые реактанты», включая ИК [139, 270]. Повышенные концентрации «реактантов» меняют устойчивость организма к свободным радикалам в повреждённой ткани, влияют на размножение бактерий.

Индикаторы острой фазы отличаются чувствительностью к воспалению, неспецифичностью к причине воспаления, способностью определить тяжесть и прогноз заболевания [160].

К лабораторным маркерам воспаления относят некоторые показатели клинического и биохимического анализов крови: лейкоциты, нейтрофилы, СОЭ, С-реактивный белок (СРБ), фибриноген, альбумин,  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\gamma$ -глобулины, иммуноглобулины. При остром воспалении увеличиваются значения показателей СРБ,  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов, при хроническом – повышаются значения показателей  $\gamma$ -глобулинов и снижаются показатели альбуминов.

Некоторые белки острой фазы воспаления относятся к «положительным»: СРБ, сывороточный амилоид А, лактоферрин, Т-кининоген, апоферритин, пептидогликаны,  $\alpha$ -1-кислый гликопротеин,  $\alpha$ -1-антитрипсин,  $\alpha$ -1-антихимотрипсин, гаптоглобин (Hr), фибриноген, церулоплазмин,  $C_3$  и  $C_4$  компоненты комплемента,  $\alpha$ -2-антиплазмин. Другая группа белков относится к «отрицательным»: альбумин, трансферрин,  $\alpha$ -липопротеид, преальбумин, тироксинсвязывающий глобулин. При воспалении концентрация «положительных» белков (глобулинов) растет с большой (6–8 час) или малой (72 час) скоростью, количественные уровни «отрицательных» белков (альбуминов) снижаются на 30–60%, концентрация «нейтральных» белков ( $\alpha$ -2-макроглобулин, гемопексин, иммуноглобулины) не меняется и остается в пределах нормальных значений.

Поздний ответ расценивается как специфический, так как в состав  $\beta_2$ -глобулинов входят IgA, IgM, IgG [8]. «Белки острой фазы» вызывают бактерицидный эффект, способствуют элиминации патогена. Практическое применение получили: СРБ, прокальцитонин (ПКТ), неоптерин (НП), пресепсин (ПСП).

СРБ стимулирует миграцию и активность лейкоцитов. В присутствии кальция СРБ связывает участки полисахаридов микроорганизмов и способствует их элиминации. Концентрация СРБ повышается при инфекционных заболеваниях. Уровни СРБ можно рассматривать как маркеры: инфекции (0,06–5,0 мг/л), сердечно-сосудистого риска (менее 1 мг/л), вирусной инфекции (10–40 мг/л),



бактериальной инфекции (40–200 мг/л), сепсиса (300–700 мг/л), острого воспаления (40–200 мг/л), невыраженного воспаления (10–40 мг/л), хронического воспаления (менее 10 мг/л). По его концентрациям оценивают риск тяжести воспаления: средний риск (1,0–3,0 мг/л), высокий риск (более 3,0 мг/л) [9, 364].

Прокальцитонин – это гликопротеин, предшественник кальцитонина. Повышенные показатели ПКТ при Б указывают на тяжёлое течение, возможный сепсис и неблагоприятный прогноз. Он более чувствителен и специфичен, чем СРБ и СОЭ при бактериальной инфекции [9, 309, 364]. При бактериальной и микотической инфекции уровень ПКТ увеличивается в течение 6–12 час, период полураспада – 24 час. Нормальными значениями ПКТ считают 0,05 нг/мл – 0,1 нг/мл. При бактериальной инфекции уровни повышаются до 0,3–1,5 нг/мл, при системном воспалении – до 10 нг/мл.

Повышение уровня неоптерина происходит при вирусной инфекции на 9–12-й день от начала воспаления и связано с тяжестью и прогнозом заболевания. Повышенные уровни предшественника натрийуретического пептида (NT-pro-BNP) при сепсисе указывают на неблагоприятный прогноз. Нормальные значения NT-pro-BNP – 125 пг/мл [9].

Пресепсин – маркер сепсиса, диагностирует его до клинического проявления, реагирует на воспаление быстрее ПКТ и СРБ. Уровни ПСП повышаются при бактериальной и микотической инфекции, показывают активность фагоцитоза. На макрофагах находится мембранный рецепторный белок – mCD<sub>14</sub>, который узнает бактерии, при помощи его происходит связывание с рецепторами на бактериях, активируются макрофаги, выходя в свободную циркуляцию белок становится растворимым sCD<sub>14</sub>. При активации фагоцитоза лизосомальные протеиназы расщепляют растворимый sCD<sub>14</sub> с образованием специфического фрагмента – sCD<sub>14</sub>-ST, который назвали пресепсином. Нормальными показателями ПСП считают 294,2 пг/мл.

Другие белки острой фазы также имеют диагностическое и прогностическое значения при инфекциях. Сывороточный амилоид А родственен СРБ, уровни амилоида А повышаются при воспалении инфекционного характера. Референтное

значение – 7 мг/л. Лактоферрин-ферропротеин, синтезируемый макрофагами, обладает бактериостатическим и бактериоцидным действием, является фактором врождённого иммунитета, заменяет нейтрофилы [170].  $\alpha$ -1-кислый гликопротеин, который стимулируется липополисахаридами бактерий, подготавливает бактерии для фагоцитоза, связывает эндотоксины грамотрицательных бактерий, нейтрализует и выводит их. Повышенные концентрации характерны для острой инфекции, лихорадки, пониженные концентрации наблюдают при повреждении печени, гастроэнтеропатиях. Референтное значение: 0,5–1,2 г/л.  $\alpha$ -2-макроглобулин, ингибируя протеазы, участвует в защитных механизмах против микробов, паразитов. Повышение концентрации  $\alpha$ -2-макроглобулина указывают на благоприятный исход заболевания [114]. Повышенный уровень  $\alpha$ -1-антитрипсина наблюдается при острой инфекции, распаде клеток, пониженный – при тяжёлых и хронических заболеваниях [271]. Референтное значение: 0,9–2,0 г/л. Гаптоглобин связывается со свободным гемоглобином при гемолизе эритроцитов, удаляет бактерии [170]. Повышенные уровни наблюдают при воспалении, коллагенозах, аутоиммунных заболеваниях. Сниженные показатели наблюдают при внутрисосудистом гемолизе. Референтные значения показателя зависят от возраста: от 16 до 60 лет – 1,5–2,0 г/л, старше 60 лет – 3,5–17,5 г/л. Церулоплазмин осуществляет транспорт меди к ферментам в крови, инактивирует свободные кислородные радикалы при воспалении. Повышенные уровни являются показателями острой фазы воспаления, сниженные уровни характеризуют плохой прогноз [170]. Референтное значение: 0,20–0,60 г/л. Эластаза лейкоцитов способствует выходу белков острой фазы воспаления в кровь и является ранним маркёром тяжести воспаления. Ферритин является основным белком для связывания железа при синтезе гемоглобина и относится к показателям острой фазы воспаления [170]. Референтное значение: мужчины – 30–300 мкг/л, женщины до 50 лет – 10–160 мкг/л, женщины старше 50 лет – 30–300 мкг/л. При воспалении инфекционной этиологии концентрация альбумина понижается. Референтное значение в сыворотке: 35–52 мг/л. Трансферрин связывает и транспортирует железо в ткани. Повышенные показатели характерны для состояния дефицита железа. Пониженные концентрации являются маркёром острой фазы воспаления и анемии

при хронических инфекциях [170]. Референтные значения: 2,0–3,20 г/л.

Динамику сывороточных реактантов воспаления экспериментально показали на кроликах при использовании имплантов из медицинской стали с покрытием смесью нитридов титана и гафния. После развития воспаления наблюдали снижение уровня альбуминов и повышение концентрации  $\alpha$ - и  $\beta_2$ -глобулинов, затем повышение концентрация  $\beta_2$ - и  $\gamma$ -глобулинов.

### ***Клиническое значение маркеров воспаления***

Белки острой фазы воспаления выполняют функцию косвенных индикаторов ИК при соматических заболеваниях [96, 337].

Концентрация СРБ более, чем в 100 раз, повышается в первые 6–10 часов, сохраняется в течение нескольких дней при грамположительной и грамотрицательной Б, одновременно повышаются концентрации ПКТ и НП [115]. Отмечена диагностическая роль ПКТ при инфекции дыхательных путей, менингите, ИЭ, лихорадке неясного генеза, отрицательной гемокультуре, установлено диагностическое преимущество ПКТ над СРБ, СОЭ и уровнем лейкоцитов крови [9, 364]. Уровни НП отражают продолжительность лихорадки и тяжесть воспаления при системных микозах [221]. Некоторые биомаркёры активны при инфекциях мочевыводящих путей у взрослых [121]. НП, СРБ, фибриноген служат индикаторами воспаления при сердечно-сосудистых заболеваниях. ПСП использовали для ранней диагностики ИЭ при отрицательном посеве крови [11]. При коронарном синдроме СРБ повышается на ранней стадии заболевания, концентрация фибриногена увеличивается через неделю после повышения уровней СРБ. Выявлены повышенные концентрации СРБ и НП при повреждении миокарда, атеросклерозе, ишемической болезни сердца. Отмечена клиническая значимость измененных показателей ПКТ и НП при тяжёлом течении пневмококковой пневмонии с неблагоприятным прогнозом [121]. При туберкулёзе лёгких наблюдался высокий уровень НП и низкий ПКТ.

### ***Роль маркеров воспаления в дифференциальной диагностике***

Уровень острофазовых реактантов увеличивается в ответ на повреждение тканей [55]. Постоянно повышенные уровни СРБ свидетельствуют о патологическом

процессе, но не являются диагностическими, являются маркёрами воспаления инфекционной и неинфекционной природы. Определение СРБ могут быть полезны для дифференциации истинной инфекции от контаминации [292]. Показатели уровней СРБ растут при: аутоиммунных, ревматических заболеваниях, злокачественных опухолях, при отторжении трансплантата, при осложнениях хирургических операций на кишечнике, ожирении, атеросклерозе [252]. Отмечена различная активность СРБ и ПКТ при воспалении бактериальной и вирусной этиологии. При бактериальной инфекции уровень ПКТ достигает 53 нг/мл и при вирусной инфекции – 1,5 нг/мл. Подобную картину наблюдали с концентрацией СРБ (200–300 мг/мл и не более 20 мг/л соответственно) [337]. При вирусных менингитах в плазме содержится менее 1 нг/мл ПКТ [339]. В Европе для оценки тяжести инфекционного процесса применяется исследование ПКТ у взрослых пациентов и реже определение СОЭ. Для больных в отделении БИТ показатели СРБ являются лучшими индикаторами бактериальной инфекции, чем высокая температура тела и количество лейкоцитов.

### ***Диагностический потенциал маркеров воспаления при инфекции кровотока***

Концентрации ПКТ и СРБ выше у больных с Б, чем в группе больных без Б. ПКТ оказался более ранним маркёром диагностики Б, чем СРБ. Для оценки СРБ и ПКТ больных с лихорадкой разделили на 3 группы: с Б, без Б, с контаминацией образца крови. Больных с Б подразделили по выделенным микроорганизмам на: грамположительные и грамотрицательные бактерии, грибы. Оба маркера Б диагностировали. ПКТ оказался эффективнее СРБ при дифференциации Б от состояния без Б или контаминации. Не установлены различия в уровнях СРБ у пациентов с Б и с контаминацией. Параметры ПКТ более полезны, чем СРБ для диагностики Б, но оба маркёра не подходят для дифференциации Б на грамположительную и грамотрицательную. По показателям ПКТ при Б опубликованы неоднозначные данные: высокие уровни ПКТ при грамотрицательной Б и одинаковые уровни при грамотрицательной и грамположительной Б. Концентрация ПКТ в 1,6 нг/мл считается пороговой для дифференциации бактериальных лихорадок от других лихорадочных состояний.

Индукторами появления ПКТ являются провоспалительные цитокины, эндо и экзотоксины бактерий. Высокая активность ПКТ отмечена при наличии в крови стафилококков и коринебактерий, низкая – энтерококков [9]. При очаговом воспалении уровень ПКТ ниже, чем при генерализованном, и составляет 0,5–2 нг/мл [339]. Низкие уровни ПКТ отмечены при транзиторной Б и лечении антибиотиками.

СРБ активен, неспецифичен, относится к маркёру Б, используется в качестве индикатора инфекции [115, 200]. Уровень СРБ менее 100 мг/л включён в алгоритм для определения низкого риска Б [214]. При грамотрицательной Б отмечали повышенные уровни СРБ и лейкоцитов, при грамположительной Б – показатели в норме. Высокое содержание СРБ наблюдается при циркуляции в крови стафилококков и клебсиелл [9]. Повышенные уровни СРБ регистрируют при положительных гемокультурах (101 мг/л), при контаминации гемокультуры (30,9 мг/л), при отрицательных посевах крови (34,3 мг/л). СОЭ и СРБ показали высокую чувствительность при Б (94% и 84% соответственно).

В крови у больных ИЭ отмечено высокое содержание фактора некроза опухоли (ФНО- $\alpha$ ) при стафилококковой инфекции, низкое – при наличии в крови энтерококков и коринебактерий [9, 213]. Повышенный уровень IgM показали в 11% случаев при Б.

Установлена корреляция между уровнями СРБ, обнаружением микроорганизмов при микроскопии мазков лейкоцитарного слоя крови и положительной гемокультурой при неонатальной септицемии. На основании показателей СРБ и обнаруженных микроорганизмов при микроскопии крови назначали эмпирическую антимикробную терапию без ожидания получения гемокультуры.

#### **1.4. Современная культуромика – ренессанс классических культуральных методов и повышение эффективности клинико-лабораторной диагностики в терапевтической практике**

Культуромика возникла на почве проблемы культивирования неизвестных бактерий. Она стала идеологией возрождения техники культивирования в микробиологии. Эта техника способствует расширению нашего понимания

бактериального многообразия в изучении микробиоты, потенциальных осложнений и заболеваний у человека.

Выделение микроорганизмов при ИК считается важнейшим участком в клинической микробиологии, требует большого профессионализма в технике культивирования, грамотной интерпретации результатов, высокой квалификации микробиолога [181, 226, 238]. Для успешного получения результатов требуется комплексная струдничество клиницистов с клиническими микробиологами.

Клиницист обеспечивает преаналитический этап исследования, определяя количество проб крови и отбирая пробы до начала антибактериальной терапии. Микробиолог подбирает вид и объем питательной среды, газовую атмосферу, время инкубации, метод субкультивирования, тесты для идентификации и определения антибиотикоустойчивости.

С приходом автоматизации, молекулярно-генетических методов, с интеграцией геномики и протеомики в микробиологию повысились требования к качеству взятого образца крови на исследование [124]. Автоматизированные системы с продолженным мониторингом обеспечивают рост микроорганизмов через 48 часов или не более 5 дней, включая высокотребовательные микроорганизмы, как группа НАСЕК (*Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*), *Brucella spp.*, грибы, которым необходимо долгое время инкубации и специальные среды. Однако уровень выделения часто невысокий, что вынуждает моделировать сигнальную технику в гемокультуральной системе, состав питательной среды, объем среды во флаконе, объем инокулированной крови. Повышение эффективности диагностики ИК одни исследователи связывают с увеличением количества исследуемых проб крови, другие полагают на изменения в методологии культивирования крови [339]. В последнем случае необходимо применять различные селективные условия и видоизменять гемокультуральную технику исследования крови. Один из примеров – гемокультуральная система Isolator (Wampola Laboratories, Cranbury, NY, USA), которая применяется для выделения диморфных грибов и *Bartonella spp.* Грибы обнаруживаются в этой системе в течение 3 дней. Принцип системы заключается

в методологии культивирования [226]. В рутинной микробиологической практике данный метод не применяется из-за трудоёмкости и риска контаминации образца крови. Процесс поиска усовершенствования и рационализации для диагностики ИК привел к применению молекулярно-генетических методов, которые показали возможность заменить культивирование бактерий, не решая вопросы выделения возбудителя, определения чувствительности к антимикробным препаратам. Французские исследователи решили придать посеву любого клинического материала новое дыхание, возродить классический прием выделения возбудителя, применяя всевозможные условия культурального метода исследования [236].

Первая пробная работа с целью изучения влияния разнообразных условий для повышения эффективности выделения наибольшего числа микроорганизмов из биоматериала выполнялась на пробе кала [239]. Разнообразие культуральных условий при исследовании кала позволило получить рост ранее невыделяемых и новых видов микроорганизмов. Комплексная технология, включающая разнообразные селективные условия, MALDI-ToF-масс-спектрометрию и *16S rRNA* типирование микроорганизмов, получила название культуромики. Термин введен французским микробиологом J. C. Lagier в 2012 году [235, 239].

Пусковым моментом для этого послужила метагеномика, которая изучала микробиом пищеварительного тракта человека [119, 239]. Метагеномика впервые была использована для описания состава экосистемы окружающей среды и морской воды [356]. Метагеномику используют для идентификации патогенов, определения их связи с заболеванием, и в этом случае ее называют диагностической метагеномикой, которая ставит задачу идентификации причин неизвестных заболеваний, используя принципы культуромики [298]. Культуромика дополняет современную метагеномику. Метагеномный анализ микробиоты кала человека показал многообразие кишечных микробов, открыл много «некультивируемых» бактерий в образцах кала здоровых людей [234]. Исследователи использовали 212 различных условий микробной культуромики и получили 32500 колоний, исследовали 340 видов бактерий, 7 типов, 117 родов, включая 2 редких вида, 174 новых вида микроорганизмов [235]. Применили новые

протоколы культуромики и получили 531 штаммов микроорганизмов, включая 146 известных у людей и выделяемых из кала человека, 187 бактерий и 1 архею, которых ранее не выделяли из кала людей, 197 – абсолютно новых видов микроорганизмов [239]. Молекулярно-генетические методы помогли идентифицировать новые гены микроорганизмов, выделенных из кала, расширили число бактериальных видов. Применение приемов культуромики (условия культивирования и молекулярно-генетическая идентификация) позволило идентифицировать 11 новых видов бактерий в кале у больного с анорексией [308]. Данные количественного определения микроорганизмов в кале показали, что 65% видов бактерий определены в концентрации  $10^3$  КОЕ/мл.

В лечебных целях трансплантация фекальной микробиоты применялась при *Clostridium difficile* инфекции. Кал получали от здоровых доноров, применяя 17 различных состояний культивирования. Приемы культуромики способны идентифицировать все виды бактерий в растворе синтетического стула [268].

Культивирование микроорганизма в искусственной питательной среде требует создание условий, приближенных к естественным условиям жизнедеятельности микроорганизмов. Имеется основной недостаток у гемокультивирования – требуется продолжительное время для выделения патогена в силу небольшого количества циркулирующих микроорганизмов в кровотоке: от 0,01–1 КОЕ/мл, 1–10 КОЕ/мл до  $1 \times 10^3$  –  $1 \times 10^4$  КОЕ/мл крови [122, 295]. Для гемокультивирования перспективным направлением является сочетание их с молекулярно-генетическими методами, которые укорачивают время определения возбудителя в крови [295].

#### **1.4.1. Состояние и перспективы изучения гемокультуры**

Получение положительной гемокультуры у взрослых больных зависит от объема инокулированной во флакон крови, так как каждый мл крови увеличивает рост микроорганизмов в питательной среде [302, 316]. Неадекватный объем крови снижает результат получения гемокультуры [226]. При взятии крови из катетера параллельно необходимо брать кровь из вены для правильной трактовки результатов [226]. К параметрам получения гемокультуры относят количество



проб крови, время инкубирования [124]. Руководство CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) рекомендует 2–3 сета, по 10 мл крови в каждый флакон для диагностики 90–95% ИК [148, 351]. Для гемокультивирования используют термин «сет» – комплект из аэробного и анаэробного флаконов [226, 302, 241]. Сет представлен на рисунке 1.



Рисунок 1 – Импортные аэробный и анаэробный флаконы для гемокультуры (один сет для посева крови)

В рекомендациях, предложенных на основе тридцатилетнего опыта, в 2013 году опубликована техника гемокультивирования [226, 241]. Допускаются единичные гемокультуры. При ИЭ и ЛНП зарубежные руководства рекомендуют 2–3 сета из трех разных мест взятия крови до приступа лихорадки или сразу после неё. Две или три пробы крови диагностируют 95% эпизодов Б и Ф. Взятие более трёх проб крови предполагает 3–5% случаев контаминации и увеличение числа ложноположительных результатов [289].

При ИК циркулирует небольшое количество микроорганизмов, от 1 до  $1 \times 10^4$  КОЕ/мл, последнее количество определили молекулярно-генетическим методом, поэтому рекомендуют отбирать 20–30 мл крови при одной венопункции [122], которые инокулируют во флаконы с 50–100 мл питательной среды. В современных публикациях предложено увеличить посевной объем до 40–80 мл крови для выявления возбудителей ИК в 80–96% случаев [295]. Другие исследователи предлагали увеличить объем инокулированной крови для сокращения числа проб. При посеве 3-х проб крови по 20 мл в каждый флакон микроорганизмы давали хороший рост в первом флаконе (91%) и в первых двух флаконах (99%). Для автоматизированной системы VacT/Alert также было рекомендовано три последовательных посева крови по 20 мл в течение 24 часов. При посеве по 20 мл крови в три флакона получали рост микроорганизмов в первом посеве крови в 80%,

во втором – в 88%, в третьем – в 99% случаев. При посеве 30 мл крови гемокультуру получали в 99% случаев.

Посевной объем крови изучается постоянно экспериментально. При посеве 5 мл крови рост увеличивался на 8%, при 7 мл – на 29%, 15 мл – на 25% случаев, т. е. 1 мл дополнительной крови увеличивал выделение микроорганизмов с 3% до 6,2% случаев. При посеве менее 5 мл гемокультуру получали в 13,21%, 5 мл – 17,3%, более 5 мл – до 71,24% случаев [256]. Исторически первоначально сложилось, что оптимальный объем инокулированной крови в 10 мл инокулируют в 100 мл триптозо-соевой среды, используя аэробный и анаэробный флаконы. Далее стали инокулировать по 15 мл крови в каждый из трех флаконов: 2 аэробных и 1 анаэробный. В первом флаконе гемокультура была получена в 91% и первых двух – в 99% случаев. Посевы объемов крови более 10 мл оказались более эффективными. Гемокультуру получали при инокуляции 20 мл в 25,3%–80%, 30 мл в 35,4%–47,2%, 40 мл в 47,7%–88%, 60 мл в 83,9%–99% случаев [302, 339]. В России при инокуляции по 10 мл крови в каждый из 4-х флаконов (аэробные и анаэробные), взятой из 2-х локтевых вен по 20 мл, рост микроорганизмов получали в одном флаконе в 5%, 2-х флаконах – 23%, 3-х флаконах – 32%, 4-х флаконах – 52% случаев [32]. Оптимальным объемом крови при ручной системе гемокультивирования приняли 20–30 мл крови при одном внутривенном взятии крови, посевная доза крови составляла 10 мл с инокуляцией в два аэробных и один анаэробный флаконы. Данный постулат подтвердили и для автоматизированных систем [256].

При инокулировании по 10 мл в два аэробных и два анаэробных флакона автоматизированная система ВАСТЕС 9240 показала результаты, идентичные результатам при использовании ручной техники. При инокуляции по 20 мл крови в два сета гемокультуру получали в 80% и 96% случаев. При исследовании малых объемов крови получали разные положительные результаты при использовании ВД ВАСТЕС 9240 системы: 3 мл (13,31%), 3–7 мл (15,02%), 8–10 мл (17,68%), более 10 мл (14,96%) [256]. На рост микроорганизмов в питательной среде влияет объем инокулированной крови, но данные мировой литературы разноречивы.

Отмечаются разные данные по увеличению выявления микроорганизмов из крови: 2 мл и 5 мл – на 3,3%–4,7%, 5 мл и 10 мл – на 2,2%–3,3%, 3,5 мл и 7 мл – на 3,2%, 6 мл и 11 мл – на 1,5%–3,1%, 8 мл и 16 мл – на 2,3%, 10 мл и 20 мл – на 1,7%, 10 мл и 30 мл – на 3,1% случаев, что подтверждает отсутствие единой системы для микробиологического исследования крови.

В настоящее время при ручном культивировании рекомендуют засеивать по 5 мл крови в два флакона с 50 мл питательной среды, выдерживая соотношение «кровь: среда» как 1:10. В эксперименте при инокуляции 10 мл крови в 100 мл среды получали рост патогенов в 2 раза больше, поэтому рекомендовали последний вариант. Значительный рост аэробных и факультативно-анаэробных грамположительных микроорганизмов и реже – грамотрицательных получали при инокуляции по 10 мл крови в два флакона с 70 мл аэробной (1:7) и в один флакон с 100 мл анаэробной сред (1:10). При добавлении к питательным средам смол, древесного угля соотношение допускали как 1:5 [294], что в настоящее время используют [289, 294, 241]. При соотношении «кровь: среда» как 1:5 отмечен высокий уровень ложноотрицательных результатов.

Для выбора количества проб крови оценивали результаты различных посевов крови: 1) 60 мл крови помещали в два сета из 6 флаконов (4 – аэробных и 2 – анаэробных); 2) 40 мл крови – в два сета из 4 флаконов (2 – аэробных, 2 – анаэробных); 3) 60 мл крови – в три сета из 6 флаконов (3 – аэробных, 3 – анаэробных) [302]. Самый эффективный был первый вариант. Полимикробную ИК диагностировали в 67% в первой гемокультуре и в 99,1% случаев – в третьей. Исходя из полученных результатов, рекомендовали 20–30 мл крови инокулировать в один сет из двух флаконов, но использовать два или три сета [226, 316] в течение 24 часов. Компромиссное решение состояло из двух сетов (40 мл крови), т. к. для большого взятие крови по 30 мл в три сета (90 мл) крайне затруднительно [302]. На основе получения положительных гемокультур: первой в 65,1%, первых двух в 80,4% и первых трех в 95,7% случаев разработали рекомендации. В соответствии с рекомендациями сет состоял из двух флаконов для инокуляции 10 мл крови в каждый флакон, использовать от двух до четырех сетов, т.е. от 4 до 8 флаконов на

больного, 40–80 мл крови в течение 24 часов для получения 80–96% положительных гемокультур [226]. Увеличение количества образцов крови на гемокультуру в Норвегии увеличило эффективность диагностики ИК [271]. Опубликованы результаты, полученные при одной венопункции, где положительных гемокультур больше, а контаминации меньше [159].

На выделение микроорганизма из крови влияет время взятия образца крови. В обычной практике рекомендуют брать кровь при подъеме температуры тела, т. к. считают, что в этот момент микроорганизмы циркулируют в кровотоке. Исследования показали, что Б предшествует подъему температуры в пределах 1–2 часа, температура не является предсказателем Б по сравнению с количеством лейкоцитов и наличием озноба. Рекомендуют взятие крови в течение 2-х часов после озноба [346]. Перед транспортировкой флаконы с инокулированной кровью хранят при комнатной температуре, но не более нескольких часов [226].

При ручном гемокультивировании посев крови инкубировали 7 дней, пробу крови больных ИЭ – 6 дней, в автоматизированных системах – до 5 дней, для выделения *Legionella*, *Brucella*, *Bartonella*, *Nocardia* – более 5 дней, для микобактерий – 4 недели [226]. При использовании системы ВАСТЕС 9240 инкубировали кровь в течение 5 дней и диагностировали ИК в 99,4%, на других системах – в 100% случаев. На системе ВАСТЕС NR660 в первые два дня диагностировали 73% случаев ИК, через 4 дня – 94%, через 5–7 дней – единичные случаи. Рекомендовали 4 дня инкубации. На ВасТ/Alert время инкубации составляло 5–6 дней. При использовании Difco ESP достаточно инкубации в 4 дня, потому что на 5-й день отмечали низкий рост патогенов (0,1%) и большое количество контаминантов. Система Accu Med ESP-384 показала оптимальное время инкубации в 3 дня, 83,4% патогенов давали рост в первые два дня инкубации, 94,2% – на 3-й день, 5,7% – на 4–5 день культивирования.

Для получения гемокультуры важен временной интервал между взятием проб крови. В мировой литературе описаны интервалы от 30 до 60 минут. Некоторые исследователи отрицают необходимость интервала при взятии пробы в течение 24 часов. При сепсисе отбирают образцы крови с интервалом в 30 минут.

Опубликованы и более длинные интервалы между пробами, от 6–36 до 24–38 часов [289]. В международных руководствах установлен 30–ти минутный интервал между парными пробами крови. По современным зарубежным руководствам отношение объема крови к питательной среде может соответствовать как 1:5–1:10 [289]. Показано преимущество отношения 1:10 и 1:30 и неадекватность соотношения 1:4, поэтому принято оптимальное отношение крови к питательной среде как 1:10.

«Золотой стандарт» для дифференциации патогенов от контаминантов не установлен. Для снижения уровня контаминации проб необходима тщательная обработка кожи, анализ клинических симптомов ИК, обработка антисептиком резиновой пробки флакона перед инокуляцией крови [118]. Среднее время для роста проблемных микроорганизмов – 21,4 часа, для контаминантов – 36,3 часа [118]. Смену иглы между взятием пробы крови и инокуляцией во флакон не рекомендуют [294].

#### **1.4.2. Лабораторные методы получения гемокультуры**

Основопологающим в диагностике ИК является получение гемокультуры, идентификация выделенного микроорганизма и определение его антибиотикорезистентности к антимикробным препаратам.

##### ***Практикующие методы культивирования крови***

В России лабораторные приемы для микробиологического исследования крови регламентированы Приказом МЗ № 535 от 1985 г., отечественными методическими и практическими рекомендациями (Таблица 8), по которым работают бактериологические лаборатории страны, но они не являются нормативно-методическими документами федерального уровня, отсутствует система диагностики ИК и не разработаны принципы получения гемокультуры.

За рубежом технология гемокультивирования зависит от экономического статуса страны. В странах с низким экономическим ресурсом, как страны Африки и Азии, используют упрощенные методы посева крови [156, 294]. В странах: Вьетнам, Камбоджа, Эфиопия, Ботсвана для ручного гемокультивирования среды готовят в лаборатории, используют только аэробные флаконы, идентификацию

микроорганизмов проводят биохимическим методом, уровень контаминации достигает 15% [156]. В странах с высоким экономическим уровнем применяют полуавтоматизированные и автоматизированные гемокультуральные системы [171, 177, 251, 294, 323, 334].

Отечественные рекомендации микробиологического исследования крови предлагают: для микроскопического метода готовить мазки «толстая капля» и «тонкий мазок» из цельной крови; для бактериологического – проводить посев 12–20 мл цельной крови во флакон с ватно-марлевой пробкой или в два флакона с резиновой пробкой с частотой – одна проба, две–три пробы в течение 1–2 часов, 4–6 проб – по три пробы в два последующих дня, на фоне антибиотиков – 6 проб в течение 48 часов с интервалом между взятием проб крови в 5–10 минут и соотношением крови к среде как 1:5–1:10 до 1:60 [22, 35, 36, 47, 51, 86, 88, 89, 99].

### ***Исторические варианты культивирования крови***

Исторически к модификационному методу посева крови относят метод Н. Н. Клодницкого (1934 г.), который предлагал использовать дистиллированную воду для лизиса эритроцитов в качестве питания микроорганизмов продуктами распада. А. И. Сироко (1969 г.) предложил метод «среда со стаканчиком» с лизисом форменных элементов крови [89]. Применяли также методы: фракционного посева пробы крови, посева гемолизированной крови в полужидкий расплавленный агар на чашке Петри, лизис-центрифугирующую систему и системы, содержащие антикоагулянт – EDTA и лизисный агент – сапонин, фторуглеродное соединение для выделения *Bartonella spp.* и грибов из крови, технику мембранных фильтров. Были попытки разработать экспресс-метод выделения гемокультуры, прямого посева на плотную среду [46, 61, 78, 171, 206].

В настоящее время классическим вариантом посева крови считается гемокультивирование в аэробном и анаэробном флаконах согласно рекомендациям CLSI [148]. Современные руководства по ИЭ рекомендуют для взрослых взятие 20–30 мл крови на один сет, отбирать 2–4 сета с интервалом в 30 минут [193]. Применение анаэробных флаконов было актуально в период подъема заболеваний анаэробной этиологии [282, 294], позже при снижении роли анаэробов некоторые

исследователи заменили анаэробный на дополнительный аэробный флакон. Закрытые ручные и автоматизированные гемокультуральные системы минимизируют риск контаминации, обеспечивают неоднократно субкультивирование, увеличивают эффективность получения гемокультур.

### ***Ручные и автоматизированные методы культивирования крови***

В мировой практике в настоящее время для посева крови используются ручные, полуавтоматизированные и автоматизированные гемокультуральные системы. Современные автоматизированные системы имеют преимущества: мониторируют рост микроорганизмов, уменьшают рабочую нагрузку специалистов, снижают время инкубации и уровень контаминации. Рост микроорганизма во флаконе регистрируется датчиком [295]. Для ручных систем необходимо от 48 до 66,95 часов инкубации крови для выявления микроорганизмов в 94% случаев [177, 294], для автоматизированных систем – от 16,83 до 24 часов для выявления патогенов в 91,6% случаев [177, 294].

Ручные системы просты в использовании, рост микроорганизмов осуществляют визуально, контролируют 1–2 раза в день и в конце инкубации проводят «слепое» субкультивирование. В России микробиологическое исследование крови проводится ручным методом согласно Приказу № 585 от 1985 г. [89]. В Северной Дании до 1991 года кровь инокулировали в 12 вакуумных пробирках с разными питательными средами, с 1991 года применяли систему Colorbact-A (аэробную), индикатором роста служило изменение цвета среды. Система Isolator (Wampole Laboratories, Cranbury, N. J.) относится к ручной системе с лизис-центрифугирующей техникой. Страны с низким и средним экономическим доходом используют ручные гемокультуральные системы. В Египте, Пакистане, Индии имеются автоматизированные системы для крови, но они не адаптированы к тропическому климату и очень грязной внешней среде, поэтому применяют ручную технику [294]. Инкубируют кровь в ручных системах до 7 дней, 89% патогенов выделяют к 5-му дню, на 6–7 день инкубации растут контаминанты [161, 294].

В автоматизированных системах рост микроорганизмов получают в течение

более короткого срока инкубации (3–5 дней), чем при ручных техниках гемокультивирования [294]. Нашли широкое применение автоматизированные гемокультуральные системы: API, BBL, ВАСТЕС, ВИТЕК, BacT/Alert 3D, Versa TREK [171].

Полуавтоматические системы исключают проведение «слепого» субкультивирования и не проводят высев материала «кровь-среда» на ранних часах инкубации крови. Системы обнаруживают *S.aureus* (1%), *S.pneumoniae* (5%), сем. *Enterobacteriaceae* (7%), но мало эффективны для роста стрептококков, грамотрицательных палочек, грибов [339].

В ВАСТЕС 9240 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Sparks, MD) контролируется концентрация углекислого газа каждые 10 мин при росте микроорганизмов. Рекомендуют 5 дней инкубации для определения 99,4% случаев ИК и выделения грибов до 66% случаев.

В ВАСТЕС NR 660 (Johnston laboratories, Towson, Md) используется инфракрасное излучение для определения количества углекислого газа при росте микроорганизмов. Рекомендуют 4 дня инкубации для получения роста в 94% случаев.

BD ВАСТЕС Plus Aerobic/F (BD Diagnostics, Sparks, MD, USA) – система для выделения высоко требовательных микроорганизмов [323]. Показано выявление *Brucella melitensis* в 35,2% случаев в течение 7 дней инкубации крови. Рекомендуют продолжительное инкубирование и «слепое» субкультивирование для этих возбудителей [251, 323].

В BacT/Alert колOMETрически определяется продукция углекислого газа 144 раза в день, достаточно 5–6 дней инкубации крови для выделения патогена.

BacT/Alert 3D (bioMerieux, Durham, N.C.USA) имеет FA – аэробные и FN – анаэробные флаконы, использует колориметрический сенсор. При посеве 10 мл крови и инкубации 5 дней положительные результаты получали в 43,7% и рост грибов определяли до 90% случаев [251].

Система BacT/Alert Virtuo (bioMerieux, Marey l'Etoile, France) выявляет наличие роста микроорганизмов в течение минимального времени инкубации



крови [334].

В системе Difco ESP (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) аэробные флаконы тестируются каждые 12 минут, анаэробные – каждые 24 минуты. Грамположительные бактерии и *Candida spp.* растут в анаэробном флаконе с инкубацией в 4 дня.

Versa TREK REDOX (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH, USA) рекомендует соблюдать соотношение «кровь: среда» как 1:10 и выявляет микроорганизмы в 27,4% случаев [251].

AccuMed ESP – система короткого срока инкубации, обеспечивала получение гемокультуры в первые два дня (83,4%) и три дня (94,2%), рекомендовали трех дневную инкубацию крови.

В BACTEC MYCO/F LYTIC (MFL, BDMS) (Becton Dickenson Microbiology System) инкубируют 5 мл крови для диагностики Б, микобактериемии и Ф. Сенсор регистрирует рост микроорганизмов при помощи ультрафиолетовой лампы. Система эффективно выявляет микобактерии, но слабо – грибы.

Система Isolator выявляла на 16% больше микроорганизмов, чем BACTEC, но при инкубации в течение семи дней преобладал рост контаминантов. Система Isolator определяла *S.aureus* и *S.epidermidis* эффективнее, чем двухфазная сердечно-мозговая среда. В диагностике ИК система Difco ESP показала себя эффективнее BACTEC NR 660.

Однако, отмечают недостатки при использовании автоматизированных гемокультуральных систем. Так, радиометрические системы дают ложноположительный результат при исследовании крови у новорожденных, так как их клетки крови в радиометрической системе гиперактивны. Плесневые и диморфные грибы плохо растут в некоторых гемокультуральных системах. В случае ожидания роста грибов используют Isolator с сердечно-мозговой средой, инкубирование 4 недели, посев осадка на специальные среды [226].

Следовательно, для выявления большинства наиболее распространенных возбудителей ИК рекомендовано стандартное время инкубации – 5 дней [295]; время инкубации удлиняют для медленно растущих бактерий и грибов; для

анаэробов – оно составляет более 5 дней [238].

### ***Питательная среда и газовый режим для культивирования крови***

Питательная ценность ингредиентов в культивируемой среде и оптимальная атмосфера культивирования являются важнейшими элементами для получения гемокультуры [238]. В практической работе применяют простые бактериологические среды: жидкая питательная среда, полужидкий питательный агар, полужидкая тиогликолевая среда, мясо–пептонный агар. Автоматизированные гемокультуральные системы в большинстве случаев содержат триптозо-соевую среду [213]. Для анаэробных бактерий применяют общепринятые среды, но предварительно среды восстанавливают для создания низкого окислительно-восстановительного потенциала в среде.

Для неселективных сред, с целью повышения питательности для требовательных микроорганизмов, применяются специальные пищевые добавки: дрожжевые, мясные, сердечные и мозговые экстракты, пептоны, казеин, соя, желатин, кровь. К распространенным средам относят: тиогликолевую – на основе триптического соевого бульона и тиоловую – на основе сердечно-мозгового экстракта и пептонного бульона [294]. Кроме того, также используют тиогликолятный, тиоловый, Колумбийский, бруцеллезный бульоны [294].

В типовой состав автоматизированной гемокультуральной системы входят: питательная среда, антикоагулянт, смолы, смесь древесного угля. Смолы и древесный уголь являются абсорбентами и связывают антибиотики. Для системы BacT/Alert разработан формуляр среды на сердечно-мозговой основе с добавлением экосорб и древесного угля для связывания антимикробных агентов. Среда под названием FAN создана для выделения микобактерий, грибов. Рост патогенов на среде FAN превосходит (29,7%) рост идентичных микроорганизмов в стандартном флаконе BacT/Alert (12,4%). К недостатку данной среды относят наличие древесного угля, который осложняет просмотр окрашенных по Граму мазков из материала «кровь-среда», дифференцировку грамположительных бактерий и грибов при окраске по Граму [277]. ВАСТЕС 9240 содержит трипсин-соевую питательную среду и 0,05% раствор полианетолсульфоната натрия. В

ВАСТЕС Plus Aerobic/F внесены абсорбирующие неионогенные смолы для удаления антибиотиков из пробы крови. Добавление смол и древесного угля в среду позволяет выделить микроорганизмы на фоне антибиотиков и удалить антимикробные субстанции из среды [273, 277]. Среды с древесным углем трудно использовать для идентификации микроорганизмов молекулярно-генетическими методами [331]. Наиболее часто применяемой целевой добавкой считают полианетол сульфат натрия (SPS) в концентрации до 0,05% [294]. В качестве усилителей роста используют: экстракт дрожжей, гемин, NAD-никотинамидаденин (кофактор анаэробного метаболизма), пиридоксин, парааминобензойная кислота, цистеин [169, 269, 294, 373].

«Middlebrook 7 H 9» – питательная основа для выделения микобактерий содержит неорганические соли, цитрат натрия, сердечно-мозговой экстракт, гемин, сахара, сапонин. Для получения роста *Legionella spp.* необходимы цистеин, буферный экстракт древесного угля [226].

При замене в комплекте сета анаэробного флакона на аэробный флакон эффективность выделения микроорганизмов не отличалась от комплекта сета, состоящего из аэробного и анаэробного флаконов [302]. Другие исследования подтвердили необходимость использования анаэробного флакона с двумя аэробными в трех флаконном сете, так как факультативно-анаэробные бактерии лучше давали рост в анаэробном флаконе [124].

#### **Этап субкультивирования и микроскопического контроля гемокультур**

При ручном гемокультивировании после двух-трех суток инкубации крови визуальный просмотр флаконов затруднен, поэтому выдерживают 7 сут с обязательным конечным субкультивированием, которое рекомендуют для ручных и автоматизированных систем [21]. Не советуют проводить «слепое» субкультивирование спустя первые 6 часов инкубирования, хотя выявляется 10% микроорганизмов. Рекомендуют следующие режимы выполнения «слепого» субкультивирования: с 6 до 14 часов, так как выявляли микроорганизмы в 50–85% случаев, с 6 до 17 часов – в 48–63% случаев, в течение 24 часов – в 48% случаев, в конце первого дня – в 35–48% случаев [247, 294, 295]. Рассчитали среднее время (6–

17 часов) после инокуляции крови во флакон для получения положительных результатов при субкультивировании.

Для получения изолированных колоний на агаре среднее время роста для грамотрицательных палочек составляло 2 часа (97,6%), для грамположительных кокков – 5,9 часов (64%) [208, 295]. Среднее время инкубации агаровой культуры для идентификации методом MALDI-ToF MS от 2 до 5,9 часов. Короткая инкубация на агаре в течение 5 часов позволяет идентифицировать микроорганизмы, при использовании MALDI-ToF MS, в монокультуре до 81,1% случаев и один микроорганизм из двух в полимикробной культуре до 82,7% случаев [295, 357]. При инкубации агаровой культуры в течение 24 часов метод MALDI-ToF MS определял 97,6% грамотрицательных палочек и 100,0% грамположительных кокков. [208, 295]. Короткая инкубация в 4–14 часов выявляла 85% патогенов, контаминанты в эти сроки не давали роста [295].

Следующий шаг в диагностике ИК – микроскопия материала «кровь-среда», окрашенного по Граму. Морфологическая и тинкториальная характеристики являются первыми данными для идентификации микроорганизма при подборе эмпирической терапии и выборе среды для субкультивирования. В настоящее время используют молекулярно-генетические методы для идентификации микроорганизмов в данном материале [295]. Микроскопия мазков из культуральной среды визуализирует *E.coli* в количестве  $1,4 \times 10^4$  КОЕ/мл и *S.aureus* –  $8,3 \times 10^3$  КОЕ/мл в питательной среде. На этом этапе имеется расхождение мнений. Некоторые исследователи при отрицательном результате микроскопии материала «кровь-среда» не рекомендуют заключительное субкультивирование, другие – не рекомендуют проводить микроскопическое исследование культуральной жидкости анаэробного флакона при отсутствии видимого роста.

### **1.4.3. Микробиологический спектр современных инфекций кровотока**

Видовой пейзаж ИК разнообразен, так как зависит от техники гемокультивирования и профессионализма микробиологов, а также это связано с экономическим развитием страны. В 70-х годах XX века ведущими возбудителями ИК считались *E.coli*, *S.aureus*, *S.pneumoniae*, *K.pneumoniae*. До 2007 года к лидерам

ИК относили *E.coli* (25–33%), коагулазонегативные стафилококки (КНС) (31%), *S.pneumoniae* (8,9–22%), *S.aureus* (14,2–25,1%) [337, 339]. В 2016 году возбудители поменялись местами и стали лидировать: КНС (32%), *E.coli* (20,5–27,0%), *S.aureus* (16,9–21,3%), грибы (8%) [170]. В настоящее время увеличилась частота обнаружения КНС, энтерококков. Этиологический пейзаж современной ИК характеризуется грамположительными (47–58,0%) и грамотрицательными бактериями (35,8–39%), анаэробами (5%), грибами (2–6,2%), полимикробными гемокультурами (7–25,8%) [175, 214, 351].

По данным Европейской Рабочей Группы по ГИК ведущими возбудителями являются: КНС (17,8%), *S.aureus* (15,1%), *Enterococcus spp.* (12%), *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *E.coli* (по 14,5%), *B.cereus*, грибы *p.Candida* (по 4,6%), анаэробы (1,3%) и полимикробные ИК в 22% случаев [132].

Патогенами ВГИК являются: *E.coli* (22%), *S.aureus*, *Enterococcus spp.* (10%), *S.pneumoniae*, *Streptococcus* группы *viridians* (по 10%) [152, 242]. В странах с низким экономическим развитием в этиологии ВГИК до 68,3% случаев преобладают грамотрицательные микроорганизмы: *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* [48, 120, 217, 242].

Внегоспитальные больные с оказанием медицинской помощи имеют набор коморбидных состояний, поэтому ОМПИК среди них составляет до 33–50% случаев. Ведущими возбудителями являются КНС (23%), *E.coli* (18,1%), *S.aureus* (9,2%), *K.pneumoniae* (8,2%) [217, 242, 250, 344, 364].

Этиологический пейзаж КАИК представлен КНС (53%), *S.aureus* (17,9%), *Enterobacter spp.* (9%), *Klebsiella spp.* (6%), *Acinetobacter spp.* (16,7%), *Enterococcus spp.* (8%), *Candida spp.* (9%).

Ассоциации микроорганизмов встречаются в 23,2% случаев и возможна смена возбудителей. В странах Африки полимикробность регистрировали до 4,9% случаев [294, 321].

Этиология ИК отличается по странам. В Финляндии, Норвегии, Дании, Англии, Швейцарии ИК вызвана КНС (13–31%), *E.coli* (11–31%), *S.aureus* (11–14,2%), *S.pneumoniae* (8,9%), грибами (2–4%), анаэробами (5,1%), полимикробные

ИК встречаются в 9–10,2% случаев [136, 242, 337, 339, 364]. Гендерные различия в этиологии ИК отмечены у больных Финляндии и Норвегии. У мужчин чаще встречались грамположительные возбудители (55,1%), полимикробные (6,9%) и грибковые (1,8%) ИК, у женщин – грамотрицательные микроорганизмы (51,8%) [214, 271, 337]. В Корее и Северном Вьетнаме чаще регистрировали грамотрицательную ИК (70,5%), чем грамположительную (28,2%) [161, 340]. В Японии возбудители ИК представлены *S.epidermidis* и *S.aureus* в 80–90%, полимикробность – в 5,3% случаев, в Новой Зеландии увеличилась роль *E.coli* и *S.aureus*, в Израиле – клебсиелл [242]. В Испании причиной ВГИК был *S.pneumoniae* на фоне хронических заболеваний легких (31%) и сердечной недостаточности (15,6%) [242, 243, 337, 364].

Основное заболевание откладывает отпечаток на вид возбудителя ИК. При сепсисе отмечается рост грамотрицательных возбудителей (49,1%) и снижение роли грамположительных (35,9%) [105]. При первичном ИЭ лидируют грамположительные, при вторичном – грамотрицательные микроорганизмы. Этиология ИК онкогематологических больных характеризуется грамположительными кокками (50%) с лидерством КНС (31,3%), грамотрицательными палочками (37,5%) и грибами (6,3%). У ВИЧ-инфицированных больных возбудители ИК представлены микобактериями (60%), грибами *p.Candida* (36%), криптококками, аспергиллами [43].

До 2004 г. ведущим патогеном ИК был *S.aureus*, после 2005 г. стала *E.coli*. Эти два патогена меняли друг друга в разные годы и в разных географических зонах. В 2016 г. *S.aureus* лидировал как возбудитель ИК в странах Северной Америки, *E.coli* – в странах Латинской Америки, Европе, Азии. В Австралии, Канаде, Голландии, Швеции частота *S.aureus* различалась внутри страны [170, 244, 309]. КНС чаще вызывали ГИК (54%), чем ВГИК (9%), при лихорадке выделяли до 39,1% случаев [107].

*K.pneumoniae* – возбудитель ВГИК и в 90% случаев ассоциирована с коморбидными состояниями и инвазивными процедурами, с внутрисосудистыми катетерами при пребывании больных в БИТ [116, 242, 243].

Грибы являются условно-патогенными микроорганизмами, обладают факторами вирулентности: мицелиально-дрожжевой диморфизм, способность к адгезии на эпителиальных клетках, к колонизации и инвазии. У грибов р.*Candida* дрожжевая форма переходит в мицелиальную при ограничении доступа кислорода и является инвазивной. В настоящее время кандидемия (К) составляет 90% от всех случаев инвазивного кандидоза у онкогематологических больных [19, 65]. Грибы являются потенциальными возбудителями ИК и редко высеваются из крови. В 1975 г. роль грибов увеличилась до 30%, затем наблюдали снижение, и снова подъем в 1982 г. В 1993 г. грибы составляли 10% от всех возбудителей ИК в США. К 2000 г. количество возникновения К удвоилось в Нидерландах и Финляндии и не изменилось в Норвегии и Швейцарии [167]. В настоящее время *C.albicans* и виды *non-albicans* занимают 3-е место среди выделяемых возбудителей из крови. Персистенция грибов в кровотоке достигает 44% случаев [41, 45, 175]. Из плесневых грибов возбудителями ИК по клинической значимости считают *Aspergillus fumigates*, *A.flavus*, *A.niger* [257]. ИК чаще характеризуется ассоциацией грибов с бактериями (22%) или другими видами грибов (5,2%).

При ИК описаны случаи выделения редко встречаемых микроорганизмов. Из грамположительных кокков – *Micrococcus luteus*, *Kytococcus schroeteri*, *Gemella morbillorum* [133, 276, 360]. Возбудителей *Rhodococcus equi* и *Sarcina ventriculi* в силу их постоянной циркуляции в крови относят к редкому рецессивному наследственному заболеванию в Финляндии [353]. Грамположительные палочки в роли возбудителей ИК представлены видовой группой: *Corynebacterium diphtheriae*, *C.ulcerans*, *C.jejkeium*, *C.striatum* [144, 163, 224, 303, 368, 371]; *Leuconostoc pseudomesenteroides* [209, 211]; *Listeria grayi*; *Lactobacillus casei*; *Gemella morbillorum*; *Tsukamurella tyrosinosolvans* [145]. Большая группа грамотрицательных палочек, вызывающих ИК, включает: *Acinetobacter ursingii* [327]; *Campylobacter spp.* [204]; *Myroides odoratum*; *Francisella novicida*. Единичные выделения при ИК: грамотрицательные палочки – *Bordetella pertussis*, грамположительные спорообразующие палочки – *Paenibacillus thiaminolyticus*, анаэробные кокки – *Peptoniphilus spp.* [135], спирохеты – *Brachyspira pilosicoli*.

В 2016 г. в Европе при ГИК лидировал *S.aureus* (21,3%), при ВГИК – *E.coli* (26,6%) [170, 261]. В США этиология ИК представлена: КНС (32%), *S.aureus* (20,7%), *E.coli* (20,5%), *K.pneumoniae* (7,7%), *P.aeruginosa* (5,3%), *Enterococcus faecalis* (5,2%), грибами (8%) [170]. Возбудители ИК у терапевтических больных в 60% случаев относятся к грамположительным коккам: КНС (27,1%), *S.aureus* (27,0%), энтерококки (9,9%) [104, 109, 131]. Анаэробная Б регистрируется в 5% случаев [309, 355]. В 21 веке ИК в развивающихся странах: Малавии, Южно-Центральной Африке характеризуется выделением *Salmonella typhi*, *S.enterica*, *S.pneumoniae*, *S.pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis complex*, т. е. возбудителями ИК развитых стран, ранее регистрируемые в XX веке [154, 280, 291, 315].

#### **1.4.4. Причины недостаточной информативности гемокультур. Контаминация при посеве крови**

Контаминация гемокультуры – это рост микроорганизмов, не присутствующих в кровотоке [242]. Уровень контаминации различается при взятии из периферической вены (36%), артерий (10%) и центральных вен (7%). Существуют разные методы по снижению загрязнения гемокультуры. К ним относят: соблюдение правил обработки кожи, обработки резиновой пробки флакона с питательной средой, обучение медперсонала для взятия крови из вены. Появились публикации о роли первого мл взятой крови, как источника контаминации [304]. При удалении первой порции образца крови уходят частично стерилизованные фрагменты кожи, снижается уровень контаминации на 30–34% [129]. Данный подход обозначен как «техника удаления первого образца». При удалении более 0,5 мл и менее 2,0 мл крови контаминация составляет 1% случаев [304]. Для снижения уровня контаминации в 2 раза предлагается удалять несколько первых мл крови [129]. Допускается 3% ложноположительных результатов [320].

#### **1.4.5. Интерпретация результатов гемокультуривирования крови**

Выделение условно-патогенных микроорганизмов создает сложности при интерпретации результатов посева крови. Микроорганизмы: КНС, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Cutibacterium acnes*, группа *viridians Streptococcus* рассматриваются как контаминанты и как возбудители ИК. Группа *viridians*



*Streptococcus* – в 38%, КНС в – 15–44%, энтерококки в – 78% случаев были признаны возбудителями ИК [10, 56, 186, 226, 332]. Для оценки клинического значения полученной гемокультуры существуют лабораторные критерии и учет клинических симптомов: повышение температуры тела выше 38,0° С, озноб, гипотензия [10].

### **1.5. Методы визуализации при микробиологическом исследовании крови**

Микроскопическое исследование биологического материала относится к методам ускоренной лабораторной диагностики. Ценность метода состоит в экспрессном обнаружении бактерий, грибов, раннем назначении эмпирической терапии. В литературе известна диагностическая эффективность микроскопического метода в обнаружении возбудителей при исследовании мазков крови [100, 112, 196, 219, 249, 262, 288, 313, 324, 336, 345]. Первое сообщение по выявлению бактерий в периферической крови микроскопическим методом сделано Raver и Davaine в 1850 году. С 1906 года диагностика инфекций данной техникой начала широко развиваться. Динамика развития метода микроскопии крови по годам представлена в таблице 7. Как следует из таблицы 7, за период в 113 лет большое разнообразие микроорганизмов было диагностировано в крови, используя первоначально технику приготовления мазка «толстая капля» и «тонкий мазок».

А. Humphrey разработал технику приготовления мазка лейкоцитарного слоя из пробы цельной крови в 1944 году. Кровь смешивали с антикоагулянтом с последующим центрифугированием. Эритроциты оседали на дно пробирки, плазма крови находилась над эритроцитами, под плазмой на слое из эритроцитов лежал тонкий белый слой – смесь лейкоцитов, тромбоцитов и склеенных с ними микроорганизмов. Микроскопия лейкоцитарного слоя крови нашла широкое применение в диагностике ИК.

Лейкоцитарный слой представляет собой концентрат микроорганизмов, находящихся в данной пробе крови. По внутриклеточному и внеклеточному расположению микроорганизмов оценивали состояние фагоцитоза. Для обнаружения стафилококков в мазке крови достаточно количества 10–50 КОЕ/мл

крови, для пневмококков и других стрептококков – 100 КОЕ/мл, для *Clostridium perfringens* – 10<sup>6</sup> КОЕ/мл крови.

Таблица 7 – Обнаружение микроорганизмов при микроскопии мазков крови за период с 1906 по 2019 гг.

Годы	Микроорганизмы	Ссылки
1906–1945	<i>N. meningitidis</i> <i>S. aureus</i> <i>Histoplasma capsulatum</i>	Andrews F.W., 1906. King W.W., 1918. Boone J.T. et al., 1935. Boger W.P., 1944. Parsons R.J. et al., 1945.
1970–1980	<i>S. pneumoniae</i> <i>Mycobacterium spp.</i> <i>Candida spp.</i> <i>Babesia microti</i>	Portnoy J. et al., 1971. Anderson A.O. et al., 1972. Drutz D.J. et al., 1972. Silverman E.M. et al., 1973 Anderson A.O. et al., 1974. Kobza K. et al., 1977. Posner M.R. et al., 1978.
1981–1990	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Mycobacterium avium complex</i> <i>Candida spp.</i>	Alvarez-Elcoro S. et al., 1984. Graham B.S. et al., 1984. Monihan J.M. et al., 1986. Nussbaum J.M. et al., 1990.
1991–1999	<i>Mycobacterium avium complex</i> <i>Candida spp.</i> <i>Rhodotorula rubra</i> <i>Capnocytophaga canimorsus</i> <i>Toxoplasma gondii</i> Малярийный плазмодий	Morgan M., 1994. Sen R. et al., 1996. Albrecht H. et al., 1996. Alias A. et al., 1996. Manabe A. et al., 1997. Berrouane Y. et al., 1998.
2000–2019	<i>Klebsiella spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Enterobacter spp.</i> <i>Capnocytophaga canimorsus</i> <i>Candida spp.</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Leishmania donovani</i> Малярийный плазмодий	Mirza I. et al., 2000 Branda J.A. et al, 2007 Inoue M. et al., 2010. Kaminami K.N.K. et al., 2011. Salam M.A. et al., 2012. Takihi I.Y. et al., 2013. Njunda A.L. et al., 2014 Hirai Y. et al., 2015. Rana C., 2015. Manzoni D. et al., 2015. Agarwal P., 2018 Singh G., 2018. Leitao T.M.J.S. et al., 2019.

Фиксированные мазки окрашивают по Граму [324]. Применяют классический метод по Граму и модификацию метода по В. Н. Копелову (1922 г.). В 1977 году G. Kronvall и E. Myhre применяли для окрашивания мазков крови флюорохром (акридин-оранж) для люминесцентной микроскопии, обладающий высокой степенью чувствительности при обнаружении микроорганизмов. В практической работе применяют виды окрашивания: метиленовый синий, по Гимза, по Граму, по Райту.

При окраске методом PAS дрожжевые клетки и псевдогрибы окрашиваются в ярко красный цвет.

Заметили, что число внутриклеточных микроорганизмов, выявленных в мазках крови, взаимосвязано с числом микроорганизмов, циркулирующих в кровотоке ( $1,2 \times 10^3 - 10^6$  КОЕ/мл). Внутриклеточно расположенный *S.aureus* способен расти в гемокультуре. В мазках крови обнаруживали анаэробы, бластоспоры, бластоконидии, псевдогрибы грибов *p.Candida*, фагоцитоз клеток грибов *Rhodotorula rubra*, *Candida guilliermondii*, стафилококки [210]. По результатам микроскопии мазка крови диагностировали ряд заболеваний до получения результатов посева крови: бабезиоз, *Mycobacterium avium complex* диссеминированная инфекция, синдром приобретенного иммуно-дефицита (СПИД), токсоплазмоз, системный кандидоз, пневмококковая Б, гистоплазмоз, лейшманиоз, малярия, лепра [288, 324].

Мазок считался положительным по находкам более двух бактериальных клеток в мазке. Микроорганизмы обнаруживаются в мазке при наличии 50 КОЕ/мл крови. Мазки микроскопируют при увеличении:  $\times 200$ ,  $\times 400$ ,  $\times 1000$ , затрачивая времени от 5 минут до 2-х часов для полного обзора всего мазка. Оптимальная затрата времени в 15–30 минут на просмотр одного стекла с использованием масляной иммерсии ( $\times 1000$ ) позволяла исследователю просмотреть 3000–5000 полей зрения. Замечена корреляция между временем, затраченным на обнаружение микроорганизмов в мазке крови, и ожидаемой Б. При затрате более 10 минут на просмотр одного стекла, Б была диагностирована от 36% до 76% случаев. При К, если концентрация клеток грибов менее 10 КОЕ/мл, положительные находки в мазке указывают на прогрессивное течение Ф [196].

Гемокультура подтверждает результаты микроскопического исследования крови в большинстве случаев. Бактериологический метод выявления ИК значительно уступает микроскопическому по скорости и эффективности диагностики. Особенно ценен микроскопический метод при диагностике Ф, так как бластоспоры и псевдогрибы грибов рода *C.albicans* обнаруживаются в мазках крови до выделения их в гемокультуре [372].

## 1.6. Молекулярно-генетические и масс-спектрометрические методы в диагностике инфекции кровотока

В настоящее время молекулярно-генетические методы широко применяются в диагностике различных инфекционных заболеваний. Внедрение ПЦР в 1985 г. и масс-спектрометрии в 1970-х годах ускорило идентификацию микроорганизмов. Техники обладают высокой чувствительностью, специфичностью, выявляют привередливые и некультивируемые патогены, гены устойчивости к антибиотикам [207]. Молекулярно-генетические технологии позволяют определять наличие микроорганизмов в положительной гемокультуре и в цельной крови [122, 140, 260, 265, 281, 306, 318, 325, 341]. Чувствительность молекулярных методов позволяет определять 3–30 КОЕ/мл для бактерий и 100 КОЕ/мл для грибов [296, 322].

Молекулярные методы подразделяют на: 1) прямые на основе гибридизации, 2) гибридизация на основе ДНК микрочипов, 3) на основе амплификации нуклеиновых кислот, 4) комбинированные [306].

При сепсисе с помощью ПЦР была показана возможность идентифицировать грамположительные, грамотрицательные бактерии и грибы [300]. Было установлено, что в ПЦР в режиме реального времени можно различать положительные результаты от контаминации и определять количество каждого патогена в случае полимикробной ИК [296]. Видоспецифические ПЦР выявляют некультивируемые микроорганизмы непосредственно в крови [296]. При ПЦР число геномных копий в образце крови составляет  $10^3$ – $10^4$  копий/мл [122, 296], что превосходит число выросших колоний на чашке. Эта разница объясняется за счет выявления ДНК умерших бактерий и бактерий, поглощенных фагоцитами.

Основанные на ДНК микрочиповые платформы детектируют и идентифицируют бактерии до вида. Метод Prove-it sepsis assay (Mobidiag, Helsinki, Finland) основан на амплификации и детекции генов: *gyrB*, *parE*, *mecA* 50-ти видов бактерий [350]. Гибридизация зондами и микрочипы детектируют микроорганизмы во флаконе с ростом при количестве  $2 \times 10^7$ – $10^8$  КОЕ/мл [199, 295, 296].

В 1975 г. метод MALDI-ToF MS был применен для микробиологии. Метод основан на автоматизированном анализе распределения белков [301]. В нашей

стране используются следующие системы: VITEK MS (bioMerieux Inc.), MALDI Biotyper CA System (Bruker Daltonics Inc.) и VactoSCREEN (Литех, Россия). Тестирование микроорганизмов возможно при субкультивировании материала «кровь-среда» на плотной среде в течение 2–4 часов. Технику MALDI-MS применяли для определения концентрации бактерий в крови при прямом исследовании пробы крови ( $10^6$ – $10^7$  КОЕ/мл) [180, 342, 343].

Флюоресцирующая гибридизация *in situ* (FISH) и цитогенетический метод применяются для определения специфической последовательности ДНК на хромосомах, специфической связи флюоресцирующих зондов на комплементарных последовательностях ДНК патогена в положительной гемокультуре – *16S rRNA* для бактерий и *18S rRNA* – для грибов. Специфическую связь просматривают в флюоресцентном микроскопе. Время выполнения FISH составляет 1,5–3 часа [229, 295]. Микрочипы определяют 95% от всех патогенов ИК с уровнем микробной чувствительности в  $10^5$  КОЕ/мл и гены устойчивости в течение 2,5–4 часов [295, 328]. Метод PNA-FISH способен определить наличие микроорганизмов в пробе не ниже  $10^5$  КОЕ/мл пробы. Молекулярно-генетические методы детекции микроорганизмов представлены в таблицах 8 и 9.

Таблица 8 – Методы детекции микроорганизмов в положительных гемокультурах [306]

Метод, фирма	Определяемые микроорганизмы	Время результата	Ссылки
<b>Прямая гибридизация</b>			
PNA-FISH (OpGen, USA)	4 грамположительных 3 грамотрицательных бактерии, 5 <i>Candida spp.</i>	2,5 час.	Deck M.K. et al., 2012. Florio W. et al., 2018
QuickFISH (OpGen, USA)	4 грамположительных, 3 грамотрицательных бактерии, 3 <i>Candida spp.</i>	30 мин.	Deck M.K. et al., 2012
Accelerate PhenoTest BC (Accelerate Diagnostics, USA)	15 грамположительных, 11 грамотрицательных бактерии 2 <i>Candida spp.</i>	1 час. 6 час.	Marschal M. et al., 2017
AccuProbe (Hologic, USA)	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i>	1 час.	Lindholm L. et al., 2004
<b>ДНК-микрочипы</b>			
Verigene (Luminex Corporation, USA)	12 грамположительных, 9 грамотрицательных бактерии	2,5 час.	Wojewoda C.M. et al., 2013
<b>Аmplификации нуклеиновой кислоты</b>			

Метод, фирма	Определяемые микроорганизмы	Время результата	Ссылки
FilmArray (bioMerieux, France)	8 грамположительных, 11 грамотрицательных бактерии, 5 <i>Candida spp</i>	1 час.	Salimnia H. et al., 2016
Xpert MRSA/SA BC (Cepheid, USA)	<i>S. aureus</i> , MRSA	1 час.	Buchan B.W. et al., 2015
BD Max StaphSR Assay (BD Diagnostics, Canada)	<i>S. aureus</i> , MRSA, коагулазонегативные стафилококки	2,5 час.	Lee J. et al., 2017
Eazyplex MRSA (Amplex Diagnostics GmbH, Germany)	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	30 мин.	Rodel J. et al., 2017
<b>Комбинированные (Мультипраймерная ПЦР и методы на основе гибридизации)</b>			
Sepsis Flow Chip (Master Diagnostica, Spain)	Более 36 бактерий, <i>Candida spp.</i>	3 час.	Galiana A. et al., 2017
ePlex BCID (GenMarkDx, USA)	20 грамположительных, 21 грамотрицательных бактерии, 16 <i>Candida spp</i>	1,5 час.	Martinez R.M. et al., 2016

Таблица 9 – Методы детекции микроорганизмов в цельной крови [296, 306]

Метод, фирма	Определяемые микроорганизмы	Время результата	Ссылки
The LightCycler SeptiFast (Roche Molecular System, Switzerland)	19 бактерии, 5 <i>Candida spp.</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	3,5–6 час/	Josefson P. et al., 2011. Salimnia H. et al., 2016. Straub J. et al., 2017
MagicPlex Sepsis Real- time Test (SeeGene, Korea)	21 бактерия, 6 грибов, более 90 патогенов до уровня генов	3–6 час.	Carrara L. et al., 2013
SepsiTest (Molzym, Germany)	более 345 бактерий, <i>Candida spp.</i> <i>Cryptococcus spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i>	6–12 час.	Rogina P. et al., 2014. Wellinghausen N. et al., 2009.
VYOO SIRS-Lab.Jena. Germany	14 грамположительных, 8 грамотрицательных, 7 грибов	8 час.	Schreiber J. et al., 2013
PLEX-ID, Abbott Molecular, USA	Более 800 (грамположительных, граммотрицательных, грибов)	6 час.	Bacconi A. et al. 2014
<b>Методы на основе магнитного-резонанса датчика T2</b>			
T2 Candida Panel (T2Biosystems, USA)	5 <i>Candida spp.</i>	3–5 час.	Mylonakis E. et al., 2015
<b>Метагеномика</b>			
iDTEST Dx Blood (PathoQuest SAS, France)	Более 1200 бактерий и вирусов	-	Parize P. et al., 2017.

Техника молекулярного обнаружения микроорганизма в цельной крови не требует инкубации посева крови, сокращает время получения результата (от 6–8 часов и до нескольких дней), выполняется на фоне антимикробных препаратов,

использует малый объем крови для анализа (1,0–1,5 мл), идентификация микроорганизмов не зависит от получения гемокультуры.

Общепринятое микробиологическое исследование крови имеет преимущество, но и серьезные недостатки: требуется несколько дней на анализ, поздно назначается целевая антимикробная терапия, снижаются показатели выживаемости больных. Молекулярно-генетические технологии позволяют сократить время исследования крови [173], но не способны определить целевой антимикробный препарат для лечения, поэтому не могут заменить бактериологическое исследование крови [207, 301]. Молекулярно-генетические методы должны дополнять и стать частью диагностической работы при микробиологическом исследовании крови [122, 296, 306].

### **Резюме**

Известно, что ИК осложняет течение пневмонии: риск ИК регистрируют до 9,6% случаев и летальность – в 63,2% случаев. К факторам риска развития ИК отнесли возраст с 64 до 79 лет и сопутствующую патологию. Эпидемиологически ИК классифицируют на ГИК, ВГИК и ОМПИК в зависимости от места возникновения ИК. Регистрируется частота возвратных Б от 9% до 13% случаев. В настоящее время частота бактериально-грибковой полимикробной ИК достигает 22% случаев. При симбиозе грибов *p.Candida* с *S.aureus* адгезивная способность грибов усиливается в 2 раза за счет бактерий. За период 2005-2012 гг. отмечается снижение лидерства *S.aureus* и *E.coli* и рост коагулазонегативных стафилококков, энтерококков, клебсиелл. COVID-19 осложняется бактериальной и грибковой заболеваниями, среди которых отмечают пневмонию (10% – 33%) и вторичные ИК (ВИК) (2% – 6%). При исследовании крови больных с COVID-19 в 91,4% случаев получали положительные бактериальные и в 5,5% – грибковые гемокультуры. Диагноз ИК ставят по анамнестическим, клиническим и лабораторным данным. К ним относят: возраст, температура тела, наличие центрального венозного катетера, продолжительность госпитализации (более 10 дней). К лабораторным маркерам воспаления относят некоторые показатели клинического и биохимического анализов крови: лейкоциты, нейтрофилы, СОЭ, С-реактивный белок (СРБ),

фибриноген, альбумин,  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\gamma$ -глобулины, иммуноглобулины. Руководство CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) рекомендует 2–3 сета, по 10 мл крови в каждый флакон для диагностики 90–95% ИК. В современных публикациях предложено увеличить посевной объем до 40–80 мл крови для выявления возбудителей ИК в 80–96% случаев. В настоящее время при ручном культивировании рекомендуют засеивать по 5 мл крови в два флакона с 50 мл питательной среды, выдерживая соотношение «кровь: среда» как 1:10. При ручном гемокультивировании посев крови предлагают инкубировать 7 дней, у больных ИЭ – 6 дней, в автоматизированных системах – до 5 дней, для выделения долгорастущих микроорганизмов – более 5 дней, для микобактерий – 4 недели. Автоматизированные гемокультуральные системы в большинстве случаев содержат триптозо-соевую среду. В 70-х годах XX века ведущими возбудителями ИК считались *E.coli*, *S.aureus*, *S.pneumoniae*, *K.pneumoniae*. До 2007 года к лидерам ИК относили *E.coli*, коагулазонегативные стафилококки (КНС), *S.pneumoniae*, *S.aureus*. В 2016 году возбудители поменялись местами и стали лидировать: КНС, *E.coli*, *S.aureus*, грибы. А. Humphrey разработал технику приготовления мазка лейкоцитарного слоя из пробы крови в 1944 году. В мазках крови обнаруживали анаэробы, бластоспоры, бластоконидии, псевдогифы грибов *p.Candida*, фагоцитоз клеток грибов *Rhodotorula rubra*, *Candida guilliermondii*, стафилококки. Современные молекулярно-генетические технологии нашли широкое применение в микробиологическом поиске, т. к. позволяют определять наличие микроорганизмов в положительной гемокультуре и в цельной крови.

Таким образом, учитывая следующие причины возникновения ИК и недостатки ее диагностики: рост числа случаев ИК при терапевтических заболеваниях, уровень летальности до 50% случаев, высокие риски возникновения ИК, включая современную вирусную COVID-19 инфекцию, широкий аспект источников инфекции для ИК, отсутствие единой системы и унифицированных алгоритмов для диагностики ИК, низкий уровень положительных гемокультур при использовании автоматизированных гемокультуральных техник, наши исследования являются актуальными и приемлемыми для практического



использования. Проблему диагностики ИК следует решать в виде разработки системы микробиологического исследования крови и интегральных диагностических алгоритмов.

**РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**  
**ГЛАВА 2. СОВРЕМЕННЫЕ ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ**  
**ИНФОРМАТИВНОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ**  
**ИНФЕКЦИИ КРОВотоКА**

Преаналитический этап наиболее ответственный в диагностическом цикле, так как на него приходится большая доля ошибок (46–68%), в результате которых 6% пациентов получают неправильное лечение, 19% больным назначают ненужные дополнительные исследования [310, 311], поэтому этот этап включен в международные документы по исследованию крови. В руководстве по клинической микробиологии («Manual of clinical microbiology», 1999) для взятия крови предлагают использовать пробирки с цитратом натрия, EDTA, гепарином. Кровь для посева отбирают при помощи венопункции, для мазков – из пальца, для получения культуры грибов используют технику лизис-центрифугирования. В последнем издании руководства по диагностической микробиологии («Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology», 7 ed., 2017) расписаны позиции для преаналитического этапа: 1) материал должен быть взят с минимальной контаминацией; 2) соблюдение оптимального времени взятия образца; 3) сбор соответствующего количества образца; 4) применение целевых устройств для взятия материала; 5) отбор материала на посев до назначения антибиотиков; 6) микроскопия материала; 7) правильная маркировка контейнеров [312]. 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 на преаналитическом этапе [76]. В отечественных рекомендациях предлагается не исследовать бактериологически кровь внегоспитальных пациентов ввиду отсутствия показаний, что является одной из главных ошибок в клинической микробиологии [88].

Преаналитический этап клинико-микробиологической диагностики ИК в нашей работе начинался со сбора анамнестических данных госпитальных и внегоспитальных больных.

## **2.1. Целевой сбор анамнеза у терапевтических пациентов**

Для сбора анамнеза разработаны карты для госпитальных и внегоспитальных больных (Приложение 1, 2). Карта для госпитального больного включает данные: анамнестические, клинические, клинико-лабораторные, бактериологические и микроскопические. Карта для внегоспитального пациента содержит анамнестические данные, жалобы пациента, сопутствующие заболевания.

На основании полученных данных и категории больных (госпитальный, внегоспитальный) определяли тактику взятия крови для микробиологического исследования.

## **2.2. Методические особенности процедуры пробоподготовки в процессе получения гемокультуры**

На преаналитическом этапе микробиологической диагностики ИК кроме сбора анамнеза и жалоб больных клиницист устанавливает режим для отбора оптимального количества проб и объема крови для исследования. «Золотой стандарт» в диагностике ИК – это получение гемокультуры, которое относится к одному из трудоемких исследований в клинической микробиологической лаборатории.

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

В нашем исследовании 10 мл цельной крови вносили в 200 мл жидкой сердечно-мозговой среды во флаконе для создания соотношения крови к среде 1:20, заправляли инертным газом для получения анаэробных условий. Отбирали парные пробы крови с интервалом 30 мин у госпитальных больных, термостатировали при +37° С до 9–10 дней и более с ежедневным визуальным просмотром наличия роста.

Нами проанализировано 1060 проб крови, взятых у 508 больных с подозрением на ИК, для изучения оптимального количества проб крови. Средняя кратность количества проб на одного больного равнялась 2,1. У госпитальных больных с ИК (325) исследовали 810 проб крови, на одного больного приходилось 2,5 пробы. У внегоспитальных больных с ИК (183) исследовано 250 проб крови,

соответственно 1,4 пробы на одного пациента. При длительном наблюдении в некоторых случаях на госпитального кардиологического больного приходилось до 16 проб крови. Взаимоотношение количества проб с результатами гемокультивирования представлено в таблице 10.

Таблица 10 – Кратность взятия проб крови у больных с гемокультурой

Пробы крови на 1 больного	Госпитальные			Внегоспитальные			Общее количество		
	число проб	в т. ч. (+)		число проб	в т. ч. (+)		число проб	в т. ч. (+)	%
		n (%)	95% ДИ		n (%)	95% ДИ			
1	71	71 (100,0)	58,9-69,3	134	134 (100,0)	97,2-100,0	205	205	100,0
2	322	207 (64,3)	36,2-57,0	74	50 (67,6)	56,3-77,1	396	257	64,9
3	84	39 (46,2)	32,5-47,0	24	14 (58,3)	38,8-75,5	108	53	49,1
4	172	68 (39,5)	30,2-63,9	8	4 (50,0)	21,5-78,5	180	72	40,0
5	30	14 (46,7)	19,1-46,0	10	4 (40,0)	16,8-68,7	40	18	45,0
6	42	13 (31,0)	26,8-73,2	0	0		42	13	31,0
7	14	7 (50,0)	13,7-69,4	0	0		14	7	50,0
8	8	3 (37,5)	5,8-39,2	0	0		8	3	37,5
9	18	3 (16,7)	5,7-51,0	0	0		18	3	16,7
10	10	2 (20,0)	1,6-37,7	0	0		10	2	20,0
11	11	1 (9,1)	8,9-53,2	0	0		11	1	9,1
12	12	3 (25,0)	18,5-61,4	0	0		12	3	25,0
16	16	6 (37,5)	58,9-69,3	0	0		16	6	37,5

Из таблицы 10 видно, что взятие одной пробы крови при соблюдении преаналитических правил и подготовки больного обеспечило получение гемокультуры в 100% случаев у госпитальных и внегоспитальных больных. При парном взятии крови у госпитальных больных получали гемокультуру в 64,3% случаев и результат зависел от количества проб крови: при 5 пробах – 45,0%, при 7 пробах – 50,0%, 16 пробах – 37,5% случаев. Дальнейшее увеличение количества проб крови снижало эффективность 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. В 19,2% случаев рост микроорганизмов не получен ни в одном из парных посевов. Анализ последовательности роста микроорганизмов по флаконам показал идентичные результаты мировым публикациям, в первом флаконе рост микроорганизмов получен чаще, чем во втором (58,2% и 42,8% соответственно). Гемокультуры в парных пробах крови были неоднородны: 73 парных флакона характеризовались в 64,0% случаев выделением одного вида микроорганизмов и в

37,0% – разных видов микроорганизмов, что характеризует полимикробность ИК. При мониторинговании кардиологических больных в течение года или нескольких лет выделяли разные виды возбудителей и наблюдали смену циркулирующих в крови микроорганизмов.

Таким образом, частота взятия пробы крови не влияла на получение гемокультуры. Увеличение количества проб крови не решало вопрос повышения эффективности получения гемокультуры. Посев одной пробы крови, соблюдение преаналитических правил и профилактики контаминации, соответствующее время отбора крови, выполнение оптимального режима культивирования создают значимые условия для эффективного получения гемокультуры. Посев крови в два парных флакона с интервалом в 30 минут обеспечивало получение гемокультуры в 64,9% случаях. Гемокультуру при исследовании всех терапевтических больных получили в 41,3% случаев, включая у госпитальных больных – в 38,3% случаев при использовании парных флаконов и у внегоспитальных пациентов – в 48,0% случаев, отбирая чаще одну пробу крови (73,2%), чем две (20,3%). Соблюдение принципов преаналитического этапа гемокультивирования влияет на эффективность диагностики инфекции кровотока.

### **2.3. Вариативное культивирование проб крови**

В процессе получения гемокультуры значение имеет соблюдение принципов культивирования крови для создания полноценной жизнедеятельности микроорганизмов в искусственных условиях. К одному из важных принципов относят атмосферу культивирования, а именно анаэробные условия.

Традиционно при диагностике ИК используют аэробные и анаэробные флаконы гемокультуральных систем культивирования крови. В настоящее время число анаэробных Б достигло 1,5% случаев среди всех положительных гемокультур, поэтому появились предложения заменить анаэробный флакон на аэробный или его отменить. Ведущие возбудители ИК относятся к факультативно-анаэробным микроорганизмам, которые способны в анаэробных условиях использовать для метаболизма субстратное фосфорилирование, брожение, а в присутствии кислорода – процесс окисления. Факультативно-анаэробные микроорганизмы при

выращивании на питательной среде предпочитают расти в анаэробных условиях. При исследовании крови доноров, практически здоровых людей, получали рост факультативно-анаэробных микроорганизмов в анаэробных условиях в 59,5% и облигатных анаэробов в 27,8% случаев [158]. При подозрении Б факультативно-анаэробные микроорганизмы первоначально давали рост в анаэробных условиях (53,0%) [18]. Авторы показали значимую роль анаэробных условий для получения роста не только строгих анаэробов, но и факультативных анаэробов, ведущих возбудителей ИК.

Мы использовали анаэробные условия во флаконах для инокулирования крови и для всего цикла гемокультивирования у госпитальных больных. Для посева крови внегоспитальных пациентов применяли технику прямого посева лейкоцитарного слоя на кровяной агар с инкубированием в аэробных и анаэробных условиях. Всего выделено 816 штаммов, включая 695 факультативно-анаэробных и 121 облигатно анаэробных микроорганизмов. Результаты выделения микроорганизмов в анаэробных условиях представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Выделение возбудителей из крови при разных газовых условиях культивирования, n (%)

Газовые условия	Микроорганизмы					
	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

Как следует из таблицы 11, аэробные условия в одинаковой степени обеспечивали рост факультативно-анаэробных микроорганизмов при ГИК и ВГИК (33,8% и 26,2% соответственно). Анаэробные условия дали рост дополнительно 293 штаммам факультативно-анаэробных возбудителей ИК, и чаще при ВГИК (60,0%), чем при ГИК (33,6%). Этот факт свидетельствует о хроническом течении инфекции в кровотоке у внегоспитальных пациентов. Анаэробные условия

гемокультивирования увеличили эффективность выделения возбудителей из крови на 42,2%.

Материал «кровь-среда» из флаконов пересевали на анаэробный 7% кровяной агар. Влияние анаэробной воздушной среды на рост факультативно-анаэробных микроорганизмов при субкультивировании представлено на рисунке 2.

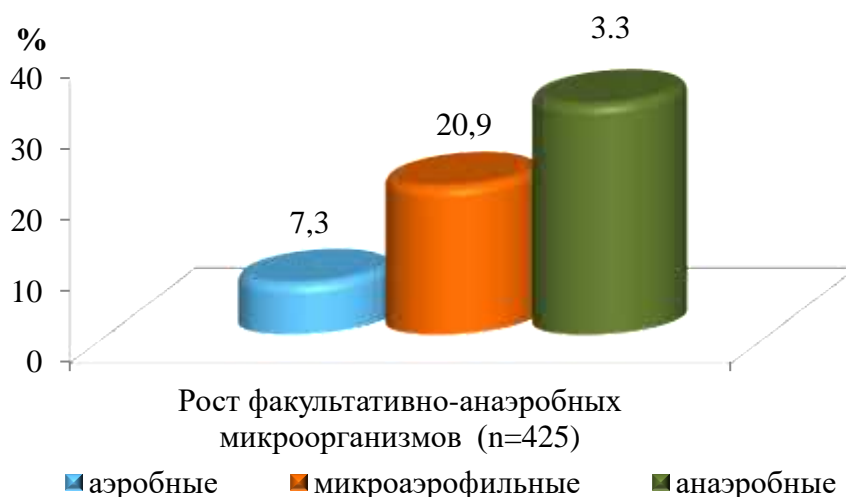


Рисунок 2 – Влияние газовых условий на рост факультативно-анаэробных микроорганизмов

Как показано на рисунке 2, при субкультивировании получен рост факультативно-анаэробных микроорганизмов в анаэробных (32,5%), микроаэрофильных (20,9%) и аэробных (7,3%) условиях. Использование общепринятых аэробных условий культивирования позволило бы выделить 7,3% штаммов возбудителей и потерять 32,5% микроорганизмов. Микроорганизмы предпочитали анаэробные условия на протяжении всего цикла культивирования. Рост факультативно-анаэробных микроорганизмов при комбинации различных газовых составляющих в воздушной среде показан на рисунке 3. Установлено, что культивирование микроорганизмов в аэробной и микроаэрофильной атмосфере позволит выделить до 6,8% штаммов. Дополнение анаэробных условий к микроаэрофильным повысило эффективность роста микроорганизмов до 9,2% случаев. Подключение анаэробных условий к аэробным и микроаэрофильным может обеспечить эффективность выделения микроорганизмов до 23,3% случаев, т. е. в 3,4 раза больше по отношению к общепринятым.

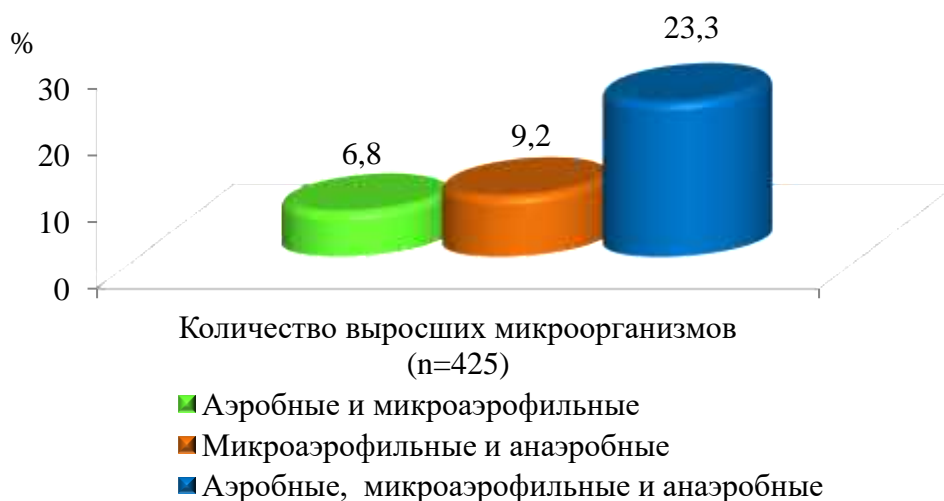


Рисунок 3 – Рост микроорганизмов при комбинации различных газовых условий

Таким образом, анаэробные условия культивирования обеспечивают эффективный рост факультативно-анаэробных микроорганизмов по причине биологической жизнедеятельности в условиях связанного кислорода в кровотоке. При инокуляции крови в аэробный флакон микроорганизмам требуется время для адаптации в новых условиях. При ИК циркулирует незначительное количество бактерий и единичные микроорганизмы попадут в 10 мл посевной дозы, поэтому аэробные условия становятся не очень пригодными в искусственных условиях.

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

При культивировании в искусственных условиях необходимо обеспечить высокопитательной средой для полноценной жизнедеятельности микроорганизмов. Питательная среда – основной компонент в культивировании микроорганизмов. Несмотря на расширение использования молекулярно-генетических методов в диагностике инфекционных заболеваний, бактериологическое исследование остается лидирующим [174, 235].

В мире сегодня насчитывается более 5000 прописей питательных сред. В России панкреатический гидролизат рыбной муки является основой большинства питательных сред промышленного отечественного производства с номенклатурой более 400 наименований [80, 107, 108]. На российский рынок для практического здравоохранения также поступают дорогостоящие импортные среды различных



зарубежных фирм на основе сердечно-мозгового экстракта. Отечественная СМС промышленным способом не выпускается. Практические лаборатории страны используют эритрит-агар в качестве высокопитательного агара. Приказ № 535 от 1985 г. рекомендует использовать мясо–пептонный агар с добавлением 5% цельной крови [89]. Мировое микробиологическое сообщество рекомендует использовать СМС для получения гемокультур для расширения спектра возбудителей. При разработке новых сред необходимо учитывать требования: 1) должны содержать необходимые источники питания; 2) иметь специальные факторы роста; 3) источники питания должны быть в усваиваемой форме; 4) основные компоненты среды соответствовать соотношениям их в клетках; 5) иметь определенный уровень рН; 6) определенный уровень окислительно-восстановительного потенциала (Еh); 7) изотоничны; 8) стерильны.

Поэтому в нашу задачу входило разработать и апробировать доступный универсальный способ приготовления СМА, содержащий ростовые факторы: L-цистеин, гемин, витамин К<sub>1</sub>, и позволяющий выявлять широкий спектр клинически значимых возбудителей ИК.

Нами были разработаны рецептуры двух вариантов СМС: жидкой – для флаконов (для первичной инокуляции цельной крови) и плотной (для прямого посева лейкоцитарного слоя и материала «кровь-среда» при субкультивировании). При конструировании СМС использованы: сердечные и мозговые экстракты, которые готовили лабораторным путем из свежих мозгов и сердец крупного рогатого скота. Используются ферментативный гидролизат казеина (артикул 042108, НИЦФ), дрожжевой экстракт (ТУ 9182-001-23206313-95), глюкозу (ГОСТ 6038-79), натрия хлорид (ТУ 20.13.62-001-97947516-2017), натрий бикарбонат (ТУ 38401-67-108-92), тиогликолят натрия (ТУ 6-09-5033-82), гидрохлорид цистеина (Е 920), менадион (витамин К<sub>1</sub>), гемин (фактор Х), твин-80 (ТУ 6-14-938-79), агар микробиологический (ГОСТ 17206-96), дистиллированную воду (ГОСТ 6709-72), L-глутамин (аминокислота), аденин (составляющая нуклеиновых кислот), парааминобензойную кислоту (бактериальный витамин Н<sub>1</sub>), L-цистеин (ТУ 6-093252-80), никотинамид (витамин РР), L-солянокислый цистеин (ТУ 6-093252-80), азотнокислый калий

(ГОСТ 4217-77), пептон (ГОСТ 13805-76), 2-х замещенный фосфорнокислый натрий (ТУ 2148-022-00203677-07). СМС лабораторного приготовления контролировалась на: прозрачность, цветность, рН, Eh, содержание хлорида натрия, аминного азота, массовую долю влаги, сухой остаток, стерильность, стерильность добавок питательных сред, температуру плавления студня агаровой среды, температуру застудневания. Чувствительность разработанной среды, скорость роста микроорганизмов оценивали по культурально-морфологическим, биохимическим и другим признакам [23, 28, 29, 70].

#### **2.4.1. Подготовительный этап в приготовлении сердечно-мозговых сред**

Приготовление СМС для флаконов включало предварительное получение сердечно-мозгового экстракта, 1% раствора гемина, 1% раствора менадиона.

##### Приготовление сердечно-мозгового экстракта

В первый день свежие сердца и мозги крупного рогатого скота очищали от пленок, сосудов, оболочек, жира и измельчали при помощи мясорубки. Заливали одинарным количеством водопроводной воды (на 1 кг ткани – 1 л воды), оставляли на ночь в холодильнике при +4<sup>0</sup> С. Экстракты из сердец и мозгов готовили отдельно. На второй день настои доводили до кипения и кипятили 5–10 минут. Горячие экстракты фильтровывали через три слоя марли, затем через ватно-марлевый фильтр. Разливали по флаконам емкостью: мозговой экстракт – по 100 мл, сердечный – по 150 мл. Закрывали резиновыми пробками, завальцовывали металлическими колпачками, автоклавировали 15 мин при 0,7 атмосферы. Готовые экстракты хранили в холодильнике при +4<sup>0</sup> С.

Приготовление 1% раствора гемина: 1 гр. гемина растворяли в 10,0 мл 1 N раствора едкого натрия, доводили дистиллированной водой до объема 100 мл. Стерилизовали автоклавированием при 1 атм. в течение 15 минут. Хранили при +4<sup>0</sup> С.

Приготовление 1% раствора менадиона: отмеряли 1 гр. менадиона, растворяли в 100 мл 96% этилового спирта. Хранили в темном флаконе с притертой пробкой при +4<sup>0</sup> С.

#### **2.4.2. Приготовление жидкой сердечно-мозговой среды**

Нами отработан рецептурный состав СМС (Таблица 12).

Таблица 12 – 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	

Сухие ингредиенты (ферментативный гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, хлорид натрия, глюкоза, тиогликолят натрия, L-цистеина гидрохлорид, агар-агар) растворяли в дистиллированной воде, доводили до кипения и кипятили 2–3 минуты. Затем к ним добавляли стерильные мозговой и сердечный экстракты, растворы гемина и менадиона. Доводили рН до 7,4–7,6 раствором 8 N NaOH. Разливали по флаконам, закрывали резиновыми пробками, замещали воздух во флаконах чистым азотом, используя шланг с длинной иглой широкого диаметра, обкатывали флакон металлическим колпачком ручным способом (ПОК-3, ООО-Медиформ) или машинным способом (Закаточный полуавтомат ПЭР-М). Оба приспособления относятся к медицинскому оборудованию и соответствуют требованиям GMP к фармацевтическому оборудованию. Автоклавировали при 1 атмосфере в течение 15–20 мин. Хранили при +4<sup>0</sup> С.

В таблице 12 показано, что гемин, менадион, твин-80, тиогликолят натрия входят в состав среды как ростовые факторы для трудно культивируемых микроорганизмов. Тиогликолят натрия снижает окислительно-восстановительный потенциал.

Для практического использования нами апробированы разные варианты объемов флаконов и сред (Таблица 13).

Таблица 13 – Флаконы с разными объемами флаконов и сред для инокуляции соответствующих объемов крови

Объем флакона	Объем среды	Объем крови	Соотношение кровь: среда	Пациенты
50	50,0	5,0	1:10	дети
50	50,0	5,0	1:10	взрослые
150	100,0	5,0	1:20	дети
150	100,0	5,0	1:20	взрослые
150	100,0	10,0	1:10	взрослые
250	200,0	10,0	1:20	взрослые
250	200,0	20,0	1:10	взрослые

Применение различных объемов флаконов (50,0 мл – 250,0 мл), сред (50,0 мл – 200,0 мл) и разные соотношения инокулируемой крови к питательной среде (1:10-1:20) расширяет возможности их использования для проб крови, не только взятых от взрослых, но и от детей.

### 2.4.3. Приготовление сердечно-мозгового агара

Классический цикл микробиологического исследования крови предусматривает субкультивирование материала «кровь–среда» на плотной питательной среде, а также вариант прямого посева пробы крови на агаровую среду.

Разработанный СМА содержит сердечно-мозговой экстракт, как основу среды, готовится по технологии, описанной выше (жидкая СМС). Приготовление СМА состояло из нескольких этапов. 1-й этап: L-глутамин, аденин, парааминобензойная кислота, L-цистеин, никотинамид, солянокислый цистеин, азотнокислый калий растворяли в 50,0 мл дистиллированной воды. 2-й этап: микробиологический агар, пептон, глюкоза, хлористый натрий, двухзамещенный фосфорнокислый натрий растворяли в отдельной посуде в 500 мл дистиллированной воды и кипятили в течение 5–10 мин. В горячую смесь добавляли содержимое 1-го состава, мозговой экстракт, сердечный экстракт, гемин и доводили дистиллированной водой до 1000 мл. Приготовленную среду доводили рН до 7,4–7,6 раствором 8 N NaOH, разливали по 300 мл во флаконы емкостью 500 мл, закрывали резиновыми пробками, завальцовывали алюминиевыми колпачками, автоклавировали при 0,5–0,6 атм. в течение 20 минут. Готовый агар хранили в условиях холодильника. Для приготовления чашек Петри помещали флакон с СМА

в водяную баню для расплавления. Расплавленный агар остужали до  $+50^{\circ}\text{C}$ , добавляли менадион и гемолизированную кровь (на 100 мл агара 5–7 мл крови). Все содержимое хорошо перемешивали, разливали по чашкам Петри слоем до 5 мм (ГОСТ 23932–90 Е). После застывания агара среда подсушивалась и применялась для посева материала «кровь–среда» при субкультивировании или проводили прямой посев капли лейкоцитарного слоя на агар. Все посеы культивировали в аэробных и анаэробных условиях.

#### **2.4.4. Прикладные задачи в сфере лабораторно-производственной разработки и реализации целевых питательных сред**

Разработанные СМС (жидкая и плотная) апробированы с целью возможного их промышленного выпуска.

##### ***Контроль и апробация жидкой сердечно-мозговой среды***

Разработанный состав питательной среды опробован на коллекционных и диких штаммах микроорганизмов (Таблица 2, 3). Чувствительность СМС оценивали полуколичественным способом и сравнивали со «средой для контроля стерильности» (СКС) по прописи Приказа № 535 от 1985 г. Для жидкой среды посевной инокулят испытуемых штаммов составлял 10–100 КОЕ/мл. Оценка чувствительности среды определяли по рекомендациям ГОСТ Р ЕН 12322–2010 [31], т. е. по мутности среды (Таблица 14). Из таблицы 14 видно, что СМС обладает более высокой чувствительностью по сравнению со средой СКС. Так, *S.aureus* давал слабый рост в виде незначительной мутности при посевном инокуляте в 10 КОЕ/мл, другие испытуемые штаммы не давали роста при культивировании при  $+37^{\circ}\text{C}$  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 вносили 10,0 мл крови, флаконы закрывали ватно-марлевыми пробками. В 100 мл жидкой СМС также вносили 10,0 мл крови, флаконы насыщали чистым азотом, закрывали резиновыми пробками, завальцовывали алюминиевыми колпачками. Результаты выделения микроорганизмов на двух средах представлены на рисунке 4.

Таблица 14 – Чувствительность питательных сред: СМС и СКС

Типовые коллекционные и дикие штаммы микроорганизмов	Посевная доза типовых штаммов			
	10 КОЕ/мл		100 КОЕ/мл	
	СМС	СКС	СМС	СКС
<i>S. epidermidis</i>	2+	2+	2+	2+
<i>S. pyogenes</i>	2+	-	2+	1+
<i>S. mitis</i>	2+	-	2+	1+
<i>S. aureus</i>	2+	1+	2+	2+
<i>K. pneumoniae</i>	2+	1+	2+	2+
<i>P. aeruginosa</i>	2+	1+	2+	1+
<i>C. albicans</i>	1+	-	2+	-
<i>C. minutissimum</i>	1+	-	2+	1+
<i>C. ulcerans</i>	2+	-	2+	1+
<i>C. xerosis</i>	2+	-	2+	1+
<i>C. jeikeium</i>	1+	-	2+	-
<i>B. pertussis</i>	1+	-	1+	-
<i>B. bronchiseptica</i>	1+	-	2+	-
<i>S. hominis</i>	2+	1+	2+	1+
<i>R. mucilaginosa</i>	2+	1+	2+	2+
<i>N. mucosa</i>	1+	-	2+	1+
<i>B.cereus</i>	2+	1+	2+	2+

Примечание: (-) нет мутности, (1+) незначительная мутность, (2+) значительная мутность

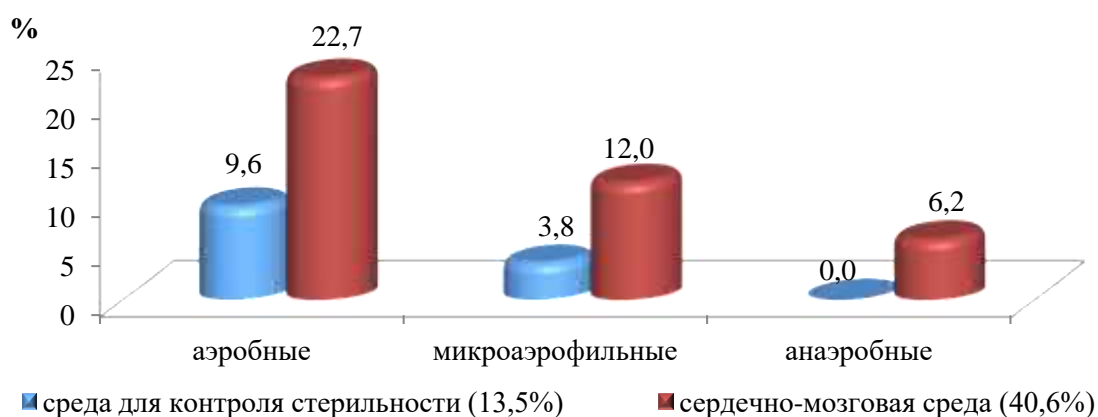


Рисунок 4 – Частота выделения микроорганизмов из крови на средах: СКС и жидкая СМС

На рисунке 4 видно, что при посеве 260 проб крови больных получен общий рост микроорганизмов чаще на СМС, чем на СКС (40,6% и 13,5% соответственно). Аэробные микроорганизмы значительно чаще давали рост на СМС, чем на СКС (22,7% и 9,6% соответственно;  $\chi^2=16,41$ ;  $p < 0,001$ ). Значимые различия роста на этих средах показали микроаэрофильные (12,0% и 3,8% соответственно;  $\chi^2=11,68$ ;  $p < 0,001$ ) и анаэробные микроорганизмы (6,2% и 0% соответственно;  $\chi^2=14,51$ ;  $p < 0,001$ ).

Нами оценена эффективность роста моно- и полимикробных гемокультур на средах: сахарный бульон, среда для контроля стерильности, разработанная сердечно-мозговая среда (Рисунок 5).

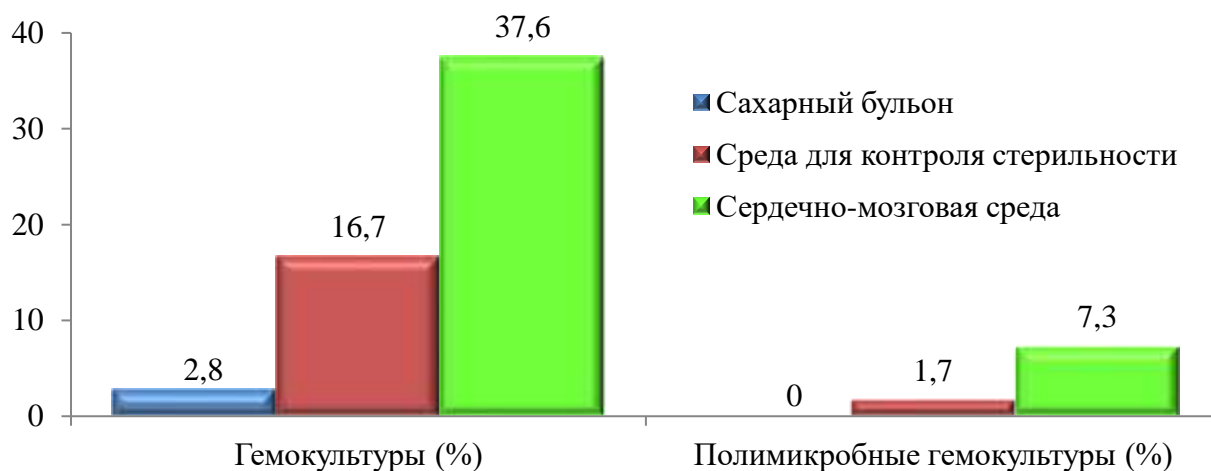


Рисунок 5 – Результаты получения гемокультур на средах: сахарный бульон, СКС и жидкая СМС

Так, на СМС выявлена высокая эффективность роста микроорганизмов – в 13,4 раза выше по отношению к сахарному бульону ( $\chi^2=34,88$ ;  $p < 0,001$ ) и в 2,3 раза выше по отношению к СКС ( $\chi^2=25,24$ ;  $p < 0,001$ ). Среди общепринятых отечественных сред СКС эффективнее сахарного бульона и разница в росте гемокультур статистически значима ( $\chi^2=8,33$ ;  $p=0,0039$ ). Полимикробные гемокультуры в 4,3 раза чаще были получены на СМС, чем на СКС (7,3% и 1,7% соответственно,  $\chi^2=7,33$ ;  $p=0,0068$ ) (статистически разница значима).

Следовательно, проведенные исследования показали эффективность СМС, как высокопитательной среды, по сравнению с сахарным бульоном и СКС. На разработку питательной среды получен патент на изобретение РФ «Сердечно-мозговая питательная среда для диагностики инфекции в кровотоке и способ ее получения» № RU 2 650 863 С 1 от 13.02.2017 г.

#### ***Апробация сердечно-мозгового агара***

Ростовые свойства среды протестированы на 5% кровяном МПА и СМА при посеве 300 образцов материала «кровь-среда» при разных условиях культивирования. Рост микроорганизмов в аэробных условиях представлен на рисунке 6.

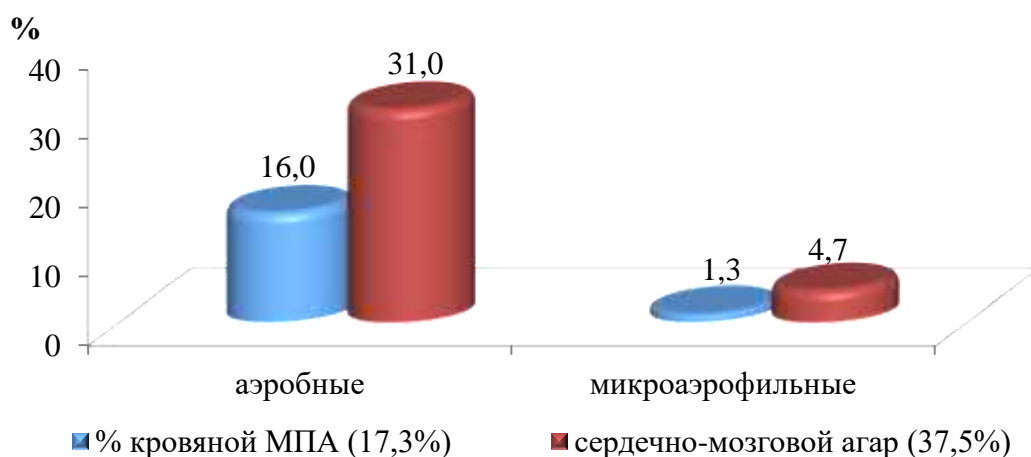


Рисунок 6 – Рост микроорганизмов при субкультивировании материала «кровь-среда» на 5% МПА и СМА в аэробных газовых условиях

На рисунке 6 нами показано, что рост микроорганизмов в аэробных условиях был лучше на СМА, чем на 5% МПА (37,5% и 17,3% соответственно). Аэробные микроорганизмы чаще в 2,3 раза давали рост на СМА, чем на 5% МПА ( $\chi^2=18,77$ ;  $p < 0,001$ ), микроаэрофильные – в 3,6 раза ( $\chi^2=5,73$ ;  $p=0,017$ ). Рост микроорганизмов в анаэробных условиях представлен на рисунке 7.

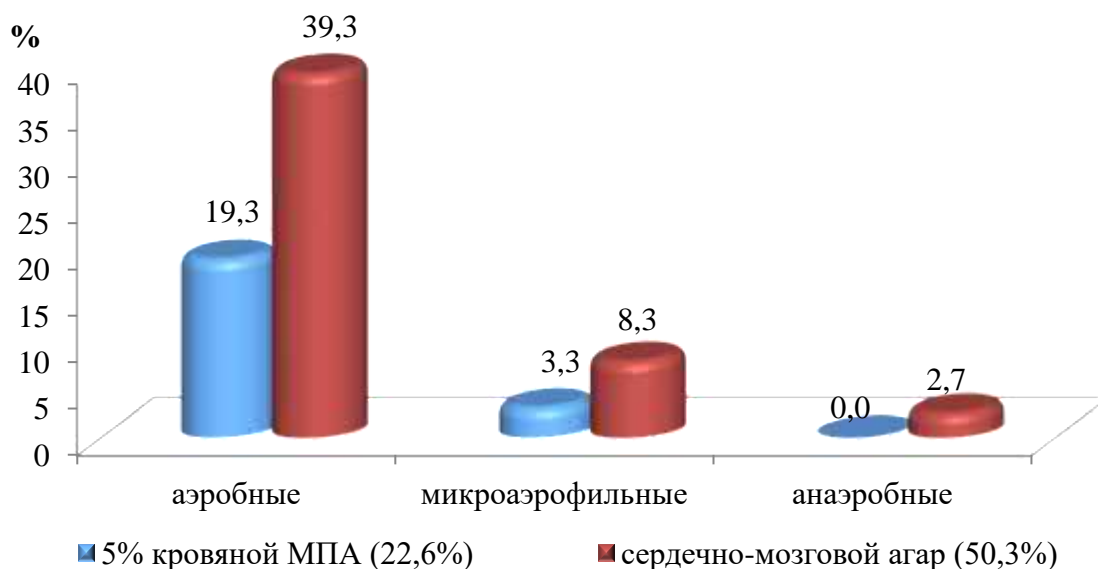


Рисунок 7 – Рост микроорганизмов при субкультивировании материала «кровь-среда» на 5% МПА и СМА в анаэробных газовых условиях

На рисунке 7 нами показано, что рост микроорганизмов в анаэробных условиях активнее на СМА, чем на 5% МПА (50,3% и 22,6% соответственно). Рост аэробных микроорганизмов на СМА преобладал в 2 раза над ростом 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 ( $\chi^2=6,21$ ;  $p=0,12$ ).

Таким образом, разработанный СМА на основе сердечно-мозгового экстракта повысил ростовые свойства среды, расширил спектр выделяемых микроорганизмов. На разработанный состав питательной среды получен патент на изобретение РФ «Способ получения питательной среды для выделения гемокультуры при диагностике инфекции кровотока» № RU 2 660 708 С 1 от 29.09.2017 г. Техническое решение жидкой и плотной сред на основе сердечно-мозгового экстракта соответствует критерию «промышленной применимости» и позволит расширить список питательных сред промышленного производства в России.

## 2.5. Оптимизация условий высокоэффективного процесса инкубирования исследуемых проб крови

Согласно Приказу № 535 от 1985 г., инкубировать кровь рекомендуется от 5 до 7 суток и в случае отсутствия видимых признаков роста микроорганизмов выдается отрицательный результат посева крови. Учитывая рекомендуемые интервалы инкубирования, нами проанализирована целесообразность дополнительного времени гемокультивирования. Придерживаясь этого мнения, мы выдерживали флаконы в термостате более 7 дней и выделяли клинически значимые микроорганизмы. Нами проанализировано время получения роста микроорганизмов в 438 гемокультурах (Рисунок 8).

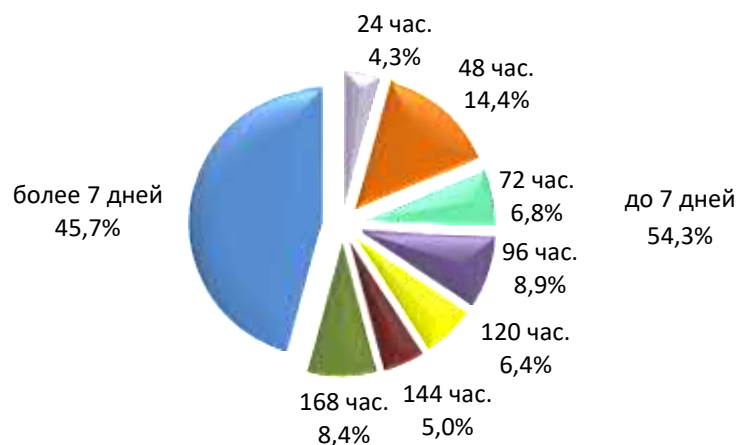


Рисунок 8 – Время получения гемокультур при ручном гемокультивировании

Анализ показал, что большая часть гемокультур в количестве 238 (54,3%)

выросла в течение 7 дней и дополнительно 200 гемокультур (45,7%) дали рост в период более 7 дней инкубации. Динамика визуального наличия роста была такова: первоначально рост был замечен через 24 часа (4,3%), затем – через 48 часов (14,4%), далее активность роста снижалась, поэтому через 96 часов рост наблюдали в 8,9% случаев и спустя 168 часов – только в 8,4% случаев. По зарубежным данным истинные возбудители ИК выделялись при инкубации от 3 до 5 дней [194, 294, 365].

При визуальном просмотре 200 флаконов с инкубацией более 7 дней 59,5% флаконов не имели видимого роста и 40,5% были с признаками роста. Некоторые микроорганизмы растут без видимых признаков роста в среде, контрольные высевы выполняли из всех флаконов на агар с культивированием в аэробных и анаэробных условиях. Для посева из анаэробного флакона использовали инсулиновые шприцы. Резиновую пробку флакона обрабатывали дезинфицирующим раствором, набирали в шприц материал в объеме 1,5–2,0 мл. Первые капли сбрасывали, а последующие по 1–2 капли наносили на питательную среду. При контрольном высеве 200 флаконов с предполагаемыми гемокультурами получили рост 239 штаммов микроорганизмов: аэробных 214 (89,5%), анаэробных 23 (9,6%) и грибов 2 (0,9%). Рост микроорганизмов получили в аэробных (33,0%), анаэробных (41,0%) и одновременно в аэробных и анаэробных (26,0%) условиях. Субкультивирование в анаэробных условиях повысило диагностическую эффективность ИК на 41,0%. Гемокультуры характеризовались мономикробным и полимикробным составом (84,0% и 16,0% соответственно). Микробный пейзаж исследуемых гемокультур представлен в таблице 15.

В таблице 15 показано, что из 200 гемокультур получили 239 штаммов микроорганизмов, из числа которых 80 (33,5%) относились к клинически значимым возбудителям ИК, включая *S.aureus*, *E.coli*, анаэробы, грамотрицательные палочки, *Candida spp.*. Аэробные микроорганизмы (214) состояли из грамположительных (87,4%) и грамотрицательных (12,6%) бактерий. Из числа грамположительных аэробов на первом месте были представители *p.Staphylococcus* (63,6%) и реже – *p. Streptococcus* (18,2%).

Таблица 15 – Микробный пейзаж гемокультур, полученных при инкубации свыше 7 дней

Виды микроорганизмов (n=239)	Количество
<i>S. aureus</i>	10
<i>S. haemolyticus</i>	18
Коагулазоотрицательные стафилококки	91
<i>S. agalactiae</i>	1
<i>S. sanguis</i>	1
<i>S. mitis</i>	32
<i>E. faecalis</i>	5
<i>C. jeikeium</i>	4
<i>Corynebacterium spp.</i>	22
<i>B. subtilis</i>	1
<i>E. coli</i>	9
<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	9
<i>A. lwoffii</i>	4
<i>Acinetobacter spp.</i>	5
<i>Nocardia spp.</i>	1
<i>Lactobacillus spp.</i>	1
<i>B. fragilis</i>	2
<i>Peptococcus spp.</i>	2
<i>Actinomyces spp.</i>	2
<i>V. parvula</i>	2
<i>C. acnes</i>	13
<i>Clostridium spp.</i>	2
<i>Candida spp.</i>	2

Среди грамотрицательных бактерий лидировали микроорганизмы сем. *Enterobacteriaceae* (66,7%). Выделение ведущих агентов из факультативно-анаэробных микроорганизмов при продолжительном времени инкубации крови является доказательством использования анаэробного типа дыхания при циркуляции в кровотоке в течение долгого времени, в условиях отсутствия свободного кислорода.

Таким образом, по данным зарубежных источников в автоматизированных системах субкультивирование отрицательных проб после 7 дней инкубации давало рост микроорганизмов в 0,2%, в нашем варианте это произошло в 45,7% случаях. Минимальное время для получения положительной гемокультуры при ручной технике гемокультивирования считается 5–6 дней. В нашем исследовании чаще видимый рост выявляли через 48 и 96 часов. Во флаконах, инкубированных более 7 дней, дополнительно получили 200 гемокультур и 239 клинически значимых штаммов микроорганизмов.

## **2.6. Особенности скрининга потенциально положительных гемокультур у терапевтических больных**

Классический метод получения гемокультуры занимает от 5–ти до 7 дней, это не устраивает клиницистов, поэтому одна из поставленных задач – разработать экспресс-метод получения гемокультуры.

Используется цельная кровь для микробиологического исследования при техниках ручного и автоматизированного гемокультивирования. Метод лизис-центрифугирования и техника мембранных фильтров являются трудоемкими для практического использования. Техника лизис-фильтрации повышала эффективность диагностики ИК, ее рекомендовали для обнаружения требовательных микроорганизмов. Ранее предложенная диагностика ИК методом фракционного посева составляла 10,9% случаев. Учитывая данный факт, нами была разработана методика посева лейкоцитарного слоя пробы крови, как экспресс-метода получения гемокультуры.

### ***Техника посева лейкоцитарного слоя пробы крови***

У внегоспитальных больных отбирали венозную кровь в количестве 4,5 мл, соблюдая правила асептики, в закрытую вакуумную систему для крови «S-Monovette» (5 мл) с 0,5 мл цитрата натрия. «Шприц-пробирка» фирмы «Sarstedt» 4-го поколения предусматривает выполнение исследований в течение 4-х часов с момента взятия крови. Глубоко посаженная 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, система в виде пробирки доставлялась в лабораторию. На рисунке 9 представлены этапы взятия крови.

После центрифугирования «шприц-пробирки» с кровью при режиме 1000 об/мин в течение 15–20 минут верхний светлый слой плазмы удаляли стерильной одноразовой пипеткой, лейкоцитарный слой в виде тонкой белой полоски лежал на эритроцитах, как представлено на рисунке 10.

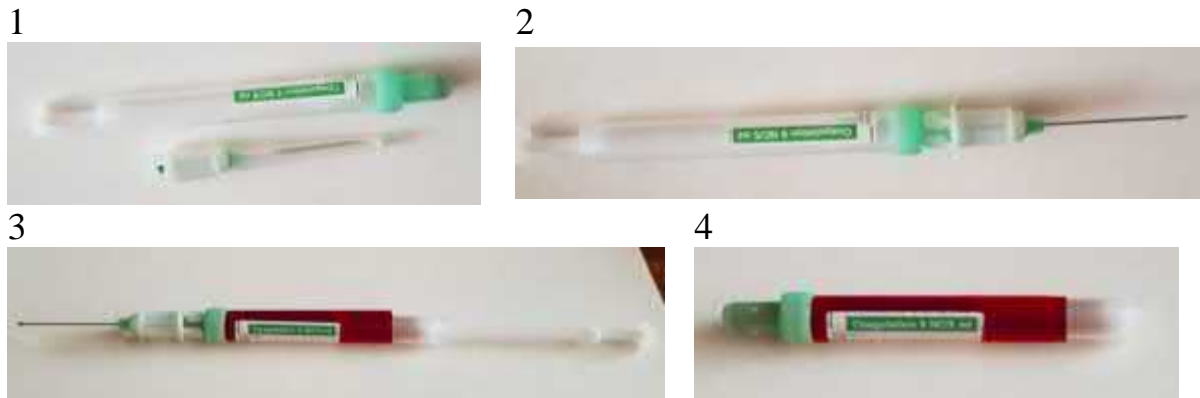


Рисунок 9 – Вакуумная промышленная «шприц-пробирка» для получения лейкоцитарного слоя при взятии венозной крови

Примечание: 1 – одноразовая стерильная «шприц-пробирка» фирмы Sarstedt 4-го поколения в упаковке, 2 - «шприц-пробирка» в собранном рабочем состоянии, 3 - «шприц-пробирка» с отобраным объемом венозной крови, 4 - «шприц-пробирка» с удаленной иглой и отломанным поршнем, трансформированная в пробирку для транспортировки

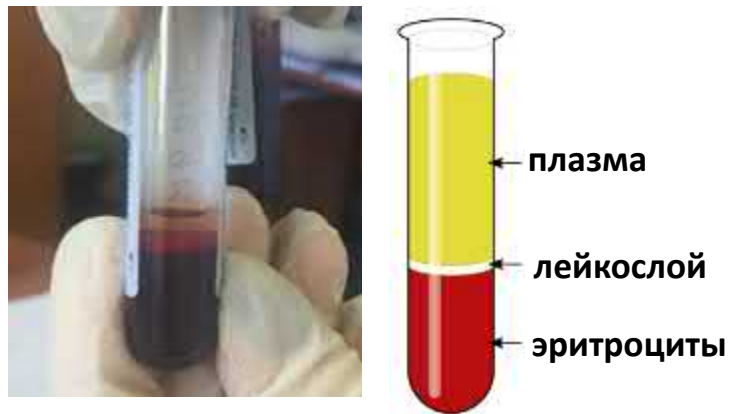


Рисунок 10 – Лейкоцитарный слой пробы крови

Лейкоцитарный слой собирали стерильной одноразовой пипеткой и капли слоя наносили на высокопитательный аэробный и анаэробный кровяной агары в чашках Петри, распределяли петлей по всей поверхности среды зигзагообразными движениями. Аэробные чашки помещали в термостат при 37°C и инкубировали в течение 5–7 дней с ежедневным просмотром. Анаэробные чашки помещали в микроанаэроустат, заправляли инертным газом. Работа с выросшими колониями проводили по общепринятым классическим методам.

С целью оценки эффективности мы сравнили результаты получения гемокультур при классическом методе и экспресс-методе. Для классического метода 10 мл цельной крови инокулировали во флакон с 200 мл анаэробной питательной среды. Для экспресс-метода применяли прямой посев лейкоцитарного слоя из 4,5 мл пробы крови на высокопитательный агар с культивированием в

аэробных и анаэробных условиях. Гемокультуру получили при классическом методе в 27,4% и экспрессным методом – в 42,8% случаев, т. е. экспресс-метод был в 1,6 раза эффективнее классического ( $p < 0,001$ ) при исследовании в 2,2 раза меньше объема крови (4,5 мл и 10,0 мл соответственно).

Отличались и количество проб крови на одного больного для получения положительных результатов при этих техниках посева. Для классического метода исследования отбирали 1,9 проб цельной крови на одного больного и 1,3 пробы крови – на посев экспресс-методом. Положительные гемокультуры получали при отборе 2,5 проб крови при классическом методе и 1,4 пробы крови – при экспресс-методе, т. е. в 1,8 раза меньше.

Мы нашли практическое применение экспресс-методу для микробиологического исследования крови у внегоспитальных больных, так как он имел ряд преимуществ: минимальный объем отбираемой крови (4,5 мл), удобная доставка материала (пробирка), достаточный временной резерв от момента взятия крови до исследования (4 часа) и высокий потенциал получения гемокультуры (48,0%).

Мы сравнили количество штаммов микроорганизмов при использовании двух методов получения гемокультур. Из общего количества полученных штаммов (816) классическим методом получили 519 (63,6%) и экспресс-методом – 297 (36,4%) штаммов, но относительный показатель количества выделенных микроорганизмов на 100 гемокультур преобладал при экспресс-методе относительно классического (144,2 и 119,0 соответственно). Эффективность диагностики полимикробных гемокультур не отличалась (50,7% и 49,3% соответственно).

Разработанный метод получения гемокультуры отнесли к экспрессному, так как метод сокращает сроки получения результата. Кроме того, применение разработанного метода дает возможность использовать MALDI ToF-MS для идентификации выросших колоний уже на следующий день от момента посева пробы крови на агар, т. е. получить ответ уже можно на второй день от момента поступления крови в лабораторию.

Таким образом, экспресс-метод получения гемокультуры показал

эффективную лабораторную диагностику ИК при взятии небольшого объема крови, минимального набора количества проб, сокращения времени получения результата, отсутствие необходимости закупать дорогие импортные гемокультуральные автоматизированные системы и флаконы к ним для микробиологического исследования крови. На разработанный экспресс-метод получен патент на изобретение «Способ диагностики бактериемии» РФ № RU 2098486 С 1 от 10.12.1997 г.

### **2.6.1. Пути повышения информативности методов визуализации микроорганизмов в диагностическом материале**

Разработанный экспресс-метод получения гемокультуры ещё не является экспрессной диагностикой ИК, поэтому была поставлена цель – разработать и апробировать экспрессный вариант диагностики инфекции в крови.

Бактериологические методы исследования не позволяют выделить максимальное количество микроорганизмов из биологического материала, включая кровь, поэтому диагностика должна начинаться с микроскопии материала. Микроскопическое исследование крови относится к экспрессному диагностическому приему, дающему информацию о микроорганизмах в пределах одного-двух часов с момента поступления материала в лабораторию. А. Humphrey в 1944 году изменил технологию приготовления мазка крови для микроскопического исследования, которая значительно повысила эффективность обнаружения микроорганизмов в крови. Он разработал метод получения лейкоцитарного слоя из пробы периферической крови, технику приготовления мазка и объяснил диагностическую ценность данного подхода. Поэтому задачей нашего исследования было применение этого метода для диагностики ИК у терапевтических больных.

#### ***Техники приготовления мазков крови***

Результаты микроскопии мазков крови обеспечивают информацией, необходимой в случае отсутствия гемокультуры. Приказ № 535 [89] рекомендует готовить «толстый» мазок в виде капли. В клинической практике применяют «тонкий» мазок, выполняемый техникой «двух стекол».

Первоначально нами был применён «капельный» метод приготовления мазка крови согласно Приказу № 535 [89], затем мы разработали метод, обозначив его как «пробирочный», т. к. в лаборатории готовили центрифужную пробирку с 0,5 мл 5% цитрата натрия и в нее добавляли 4,5 мл цельной крови. После центрифугирования при 1500 об/мин в течение 15–20 минут получали лейкоцитарный слой и капли слоя переносили на предметное стекло, выполняли мазок техникой «двух стекол», высушивали, фиксировали, окрашивали по Граму.

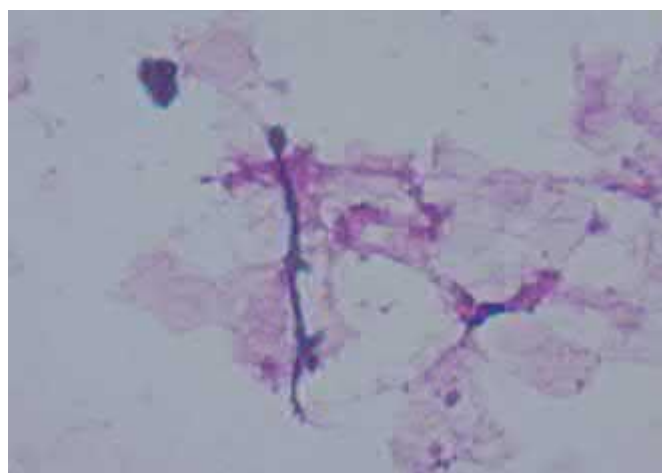
Позже появилась возможность использовать вакуумные шприцы промышленного производства с цитратом натрия, которые трансформировались из шприца в пробирку («шприц-пробирка»). При этом варианте отпала необходимость отдельно отбирать кровь для микроскопии. После центрифугирования при режиме, как упоминали выше, получали лейкоцитарный слой, который использовали в качестве материала для исследования. Слой состоял из лейкоцитов, тромбоцитов и микроорганизмов в свободном и фагоцитированном состоянии. Из лейкоцитарного слоя крови готовили по два стекла-мазка техникой «двух стекол», окрашивали по Граму. Препараты микроскопировали при  $\times 1000$  увеличении, использовали микроскопы: МИКРОМЕД-1, ЛОМО, Россия (иммерсионный объектив МИ 90–1,25 и окуляр К 7) и Axio Scope A1 (объектив EC Plan-NEOFLUAR 100 $\times$ 1,3; окуляр PI 10 $\times$ 23 Br foc, Carl Zeiss, Германия). Результаты микроскопии мазков лейкоцитарного слоя пробы крови на рисунке 11 (А, Б, В, Г).

Мы оценили совпадение положительных находок при микроскопии с результатами получения положительных и отрицательных гемокультур. При положительной гемокультуре микроорганизмы обнаружили в мазках крови в 2,2 раза чаще, чем не находили (69,2% и 30,8% соответственно;  $p < 0,001$ ), т. е. 2/3 выросших микроорганизмов предварительно выявлялись при микроскопии мазка крови. При отрицательной гемокультуре в 61,3% случаев определяли микроорганизмы в крови микроскопически, что показывает диагностическую значимость микроскопического метода при ИК.

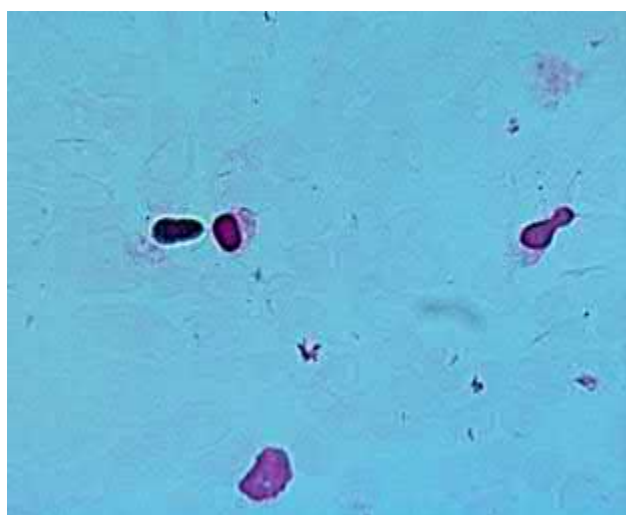




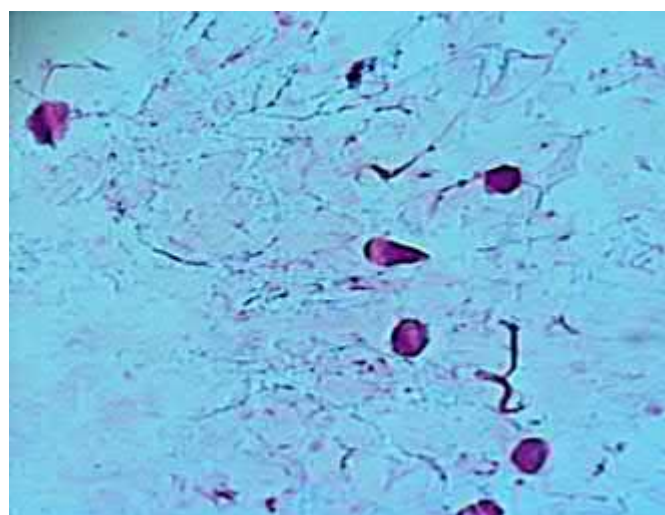
А



Б



В



Г

Рисунок 11 – Результаты микроскопии мазков лейкоцитарного слоя пробы крови  
 Примечание: А. Цепочка грамположительных стрептококков в мазке лейкоцитарного слоя пробы крови, x1000 (окраска по Граму) (МИКРОМЕД-1, ЛОМО, иммерсионный объектив МИ 90–1,25 и окуляр К 7); Б. Дрожжевая клетка и нить псевдомицелия в мазке лейкоцитарного слоя пробы крови, x1000 (окраска по Граму) (МИКРОМЕД-1, ЛОМО, иммерсионный объектив МИ 90–1,25 и окуляр К 7); В. Почкующиеся дрожжевые клетки в мазке лейкоцитарного слоя пробы крови, x1000 (окраска по Граму) (Axio Scope A1 (объектив EC Plan-NEOFLUAR 100x1,3; окуляр PI 10x23 Br foc, Carl Zeiss, Германия); Г. Дрожжевые клетки и нити псевдомицелия в мазке лейкоцитарного слоя пробы крови, x1000 (окраска по Граму) (Axio Scope A1 (объектив EC Plan-NEOFLUAR 100x1,3; окуляр PI 10x23 Br foc, Carl Zeiss, Германия)

Мы также сравнили разные техники приготовления мазков крови («капельная», «пробирочная» и «шприц-пробирка») с целью оценки эффективности обнаружения микроорганизмов микроскопическим методом. В исследование было включено

1287 мазков проб крови. Сравнительный анализ показал, что «капельная» техника приготовления мазков крови показала самый низкий уровень обнаружения микроорганизмов в крови по сравнению с «пробирочным» и методом «шприц-пробирки» (52,6%, 65,6% и 98,2% соответственно;  $\chi^2=282,4$ ;  $p < 0,001$ ). Операционные характеристики разных методов приготовления мазков крови для исследования представлены в таблице 16.

Таблица 16 – 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

Из таблицы 16 видно, что наибольшую степень чувствительности (100,0%) показал метод приготовления мазка при помощи «шприц–пробирки» по отношению к «пробирочному» (66,5%) и «капельному» (54,4%). Чувствительность «пробирочного» метода была выше «капельного». Более высоким положительным прогнозом (54,1%) обладала техника приготовления мазка при помощи «шприц-пробирки», чем «пробирочная» (27,5%) и «капельная» (36,4%) техники.

Таким образом, индикация микроорганизмов в крови при ИК в 75,4% случаев микроскопическим методом позволяет обозначить этот метод, как экспрессный для диагностики ИК. Обнаружение дрожжевых клеток и нитей псевдомицелия при микроскопии при отсутствии роста грибов в гемокультуре является важной диагностической информацией, позволяющей назначать эмпирическую терапию. Эффективность выявления микроорганизмов при микроскопии зависит от техники приготовления мазков. Совпадение положительных результатов микроскопии и посева, обнаружение микроорганизмов микроскопически при отсутствии гемокультуры подтверждает диагностическую роль микроскопического метода. Микроскопия мазка крови дает возможность в более ранние сроки диагностировать ИК и дать информацию для назначения эмпирического антимикробного лечения.

### *Усовершенствование приготовления мазков крови*

При окрашивании по Граму розовый фон мазка из-за эритроцитов затруднял обнаружение грамотрицательных бактерий, поэтому была поставлена задача модификации приготовления мазка с целью повышения качества обнаружения грамотрицательных микроорганизмов.

Любое усовершенствование технического приема повышает эффективность работы. Выявление грамотрицательных возбудителей важно при диагностике госпитальной инфекции, особенно в кардиохирургии. В связи с этим нами разработан метод «осветления» мазка для выявления грамотрицательных микроорганизмов. Устранение розового фона мазка крови возможно путем гемолиза эритроцитов, которое происходит при контакте с водой. При разнице осмотического давления воды и эритроцита вода поступает в эритроцит, вызывает его набухание и разрыв оболочки. Мазок из лейкоцитарного слоя готовили по технике, описанной выше, высушивали на воздухе. Он имел розовую окраску. Покрывали площадь мазка дистиллированной водой на 2–5 сек, сливали воду. За это время эритроциты разрушались и удалялись. Мазок приобретал вид «светлого» стекла. Мазок высушивали, фиксировали и окрашивали по Граму. При микроскопии хорошо просматривались грамотрицательные палочки (Рисунок 12).



Рисунок 12 – Грамотрицательные палочки в мазке лейкоцитарного слоя пробы крови на фоне бесцветных эритроцитов (окраска по Граму) (МИКРОМЕД-1, ЛОМО, Россия (иммерсионный объектив МИ 90–1,25 и окуляр К 7))

Для обнаружения грамотрицательных бактерий в 20 мазках крови техника с гемолизированными эритроцитами значительно эффективнее техники выявления грамотрицательных микроорганизмов без гемолиза эритроцитов (94,3% и 11,4% соответственно;  $p < 0,001$ ). На разработанный метод получен патент на изобретение РФ «Способ экспресс-диагностики инфекции кровотока» № RU 2 616 249 С 1 от 20.01.2016 г.

Таким образом, метод «осветления» мазка крови повышает эффективность обнаружения грамотрицательных микроорганизмов.

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

Для индикации и идентификации микроорганизмов в крови нами было 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.

### **2.7.1. Оптимизация методики ПЦР при изучении чистых культур микроорганизмов**

Метод ПЦР применялся для определения микроорганизмов из выросших колоний на кровяном агаре. В задачу входило индикация микроорганизма и идентификация по Грам-принадлежности с целью подбора эмпирической антимикробной терапии. Нами оптимизирована методика проведения ПЦР для индикации и идентификации Грам+ / Грам– микроорганизмов.

ДНК из выросших на 10% кровяном агаре колоний чистых культур микроорганизмов выделяли методом кипячения. На первом этапе осуществляли индикацию ДНК микроорганизмов из чистой культуры по выявлению фрагмента гена *16S rRNA*. С этой целью использовали опубликованные последовательности праймеров: DG74F 5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3' и 65abR 5'-

AACTGGAGGAAGGTGGGGAY-3' [190, 227]. Состав реакционной смеси: 10x Taq buffer with KCl и 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP mix (2 mM each) (Thermo Fisher Scientific, США), 0,1 мкМ прямого и 0,1 мкМ обратного праймеров, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, США) и 2 мкл выделенной ДНК с чистой культуры выросших микроорганизмов в окончательном объеме 30 мкл. Условия амплификации: 95° С – 5 мин; 95° С – 30 сек, 65° С – 30 сек, 72° С – 2 мин (30 циклов); 72° С – 5 мин. Ожидаемый продукт амплификации 400 п. н. Амплификацию проводили в амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология, Россия). Продукты ПЦР исследовали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле при напряжении 160 V в течение 1 часа (Рисунок 13).

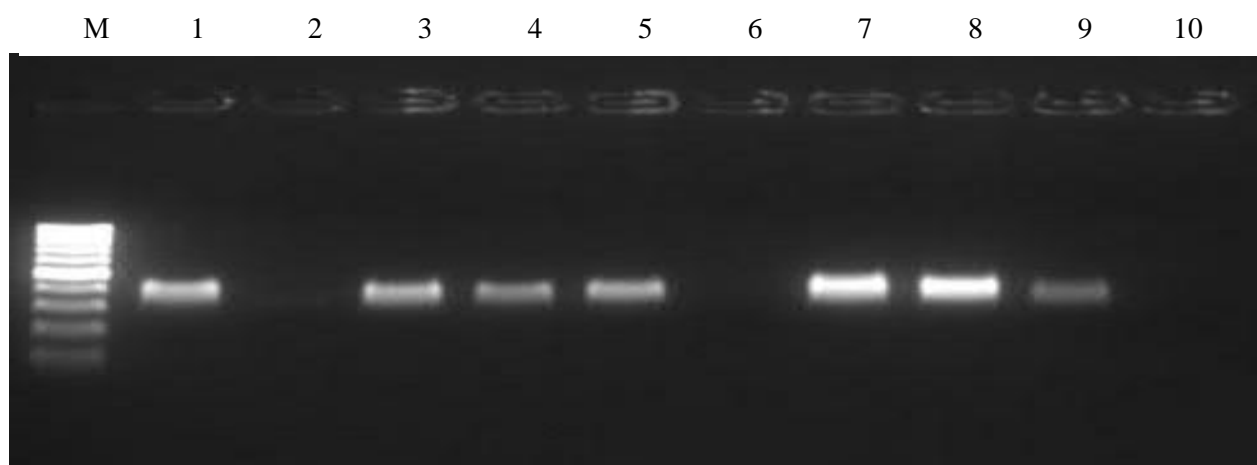


Рисунок 13 – Электрофореграмма результатов амплификации продуктов ПЦР с праймерами на фрагмент гена *16S rRNA* для индикации ДНК микроорганизмов из чистой культуры выросших микроорганизмов

Примечание: А: М - маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1, 3, 4, 5, 7, 8 - ДНК микроорганизмов; 2, 6 – отрицательные пробы; 9 - положительный контроль (ДНК штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665); 10 - отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

Наличие положительного сигнала свидетельствует о наличие в пробе ДНК микроорганизмов.

Далее проводили следующий этап с целью выявления ДНК Грам<sup>+</sup> / Грам<sup>-</sup> микроорганизмов. Для постановки ПЦР с целью выявления ДНК Грам<sup>+</sup> / Грам<sup>-</sup> микроорганизмов использовали опубликованные последовательности праймеров: DG74F 5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3' и 143R 5'-GAYGACGTCAARTCMTCATGC-3' – для идентификации Грам<sup>+</sup> микроорганизмов;

DG74F 5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3' и 68dR 5'-AYGACGTCAAGTCMTCATGG-3' – для идентификации Грам- микроорганизмов [190, 227]. Нами оптимизирован состав реакционной смеси: 10x Taq buffer with KCl и 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP mix (2 mM each) (Thermo Fisher Scientific, США), 0,1 мкМ прямого и 0,1 мкМ обратного праймеров, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, США) и 2 мкл выделенной ДНК с чистой культуры выросших микроорганизмов в окончательном объёме 30 мкл. Условия амплификации: 95° С – 5 мин; 95° С – 30 сек, 65° С – 30 сек, 72° С – 2 мин (50 циклов); 72° С – 5 мин. Для амплификаций использовали амплификатор «Терцик» (ООО «ДНК-Технология, Россия»). Электрофорез проводили в том же режиме (Рисунки 14, 15).

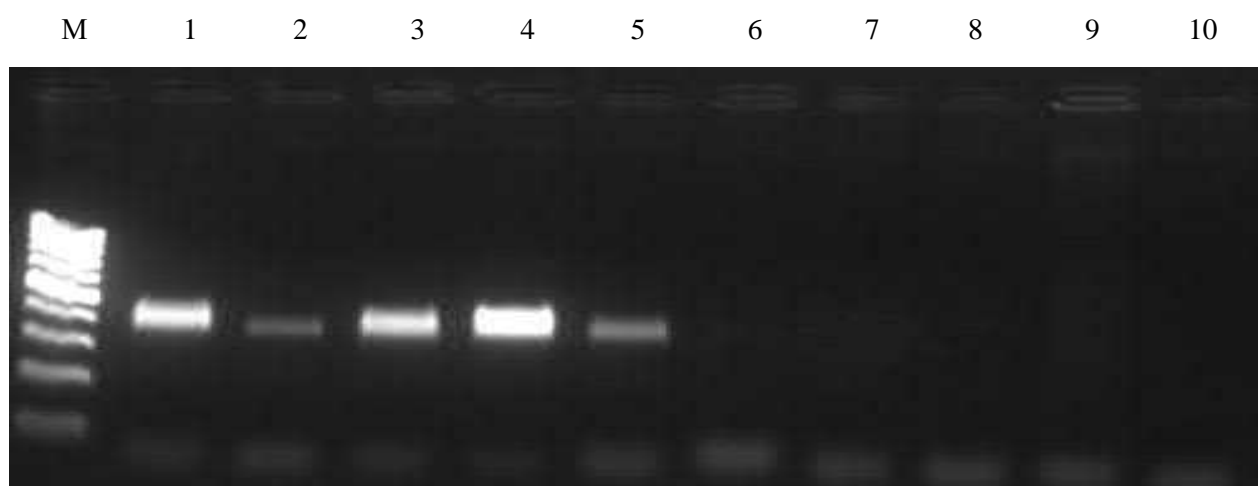


Рисунок 14 – Электрофореграмма результатов амплификации оптимизированной методики ПЦР для идентификации Грам+ микроорганизмов из чистой культуры выросших микроорганизмов (с праймерами DG74F - 143R)

Примечание: А: М – маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1–5 - ДНК Грам+ микроорганизмов; 6–9 – ДНК Грам- микроорганизмов; 10 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

Оценку аналитической специфичности оптимизированной методики ПЦР осуществляли с использованием типовых коллекционных и диких штаммов микроорганизмов (Таблицы 2, 3). С целью выявления перекрестных реакций в работе использовали концентрированные образцы матриц не ниже 10<sup>9</sup> ГЭ/мл.

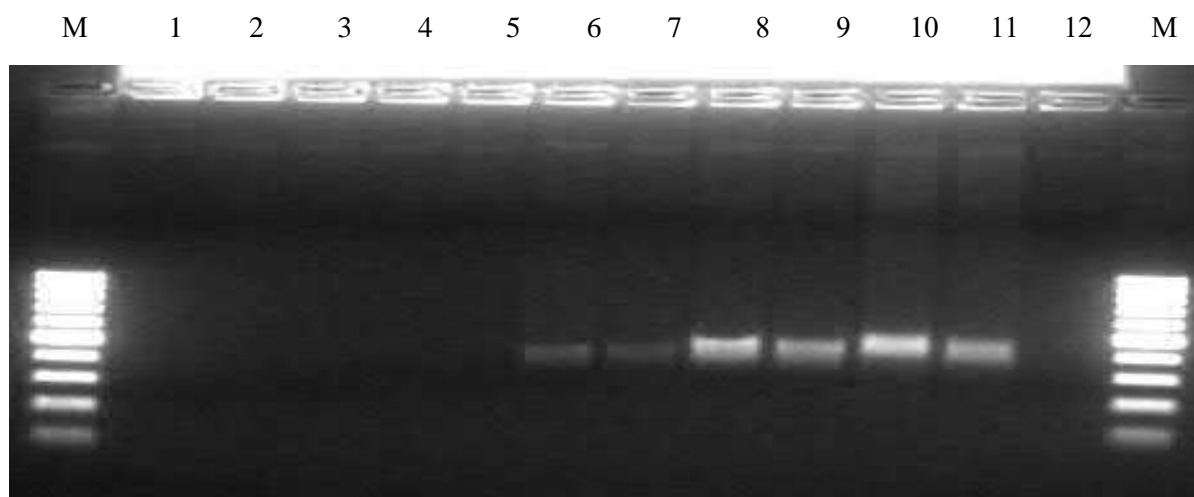


Рисунок 15 – Электрофореграмма результатов амплификации оптимизированной методики ПЦР для идентификации Грам– микроорганизмов из чистой культуры выросших микроорганизмов (с праймерами DG74F - 68dR)

Примечание: 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*); 12 - отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

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 регистрировали 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 регистрировали положительные сигналы. В результате исследования перекрестных реакций, свидетельствующих об амплификации посторонней мишени, не выявлено (Рисунки 16, 17).

Отработанная техника молекулярно-генетической идентификации грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов с чистой культуры выросших колоний при помощи ПЦР послужила основой дальнейшей работы по индикации и идентификации микроорганизмов непосредственно из лейкоцитарного слоя пробы крови.

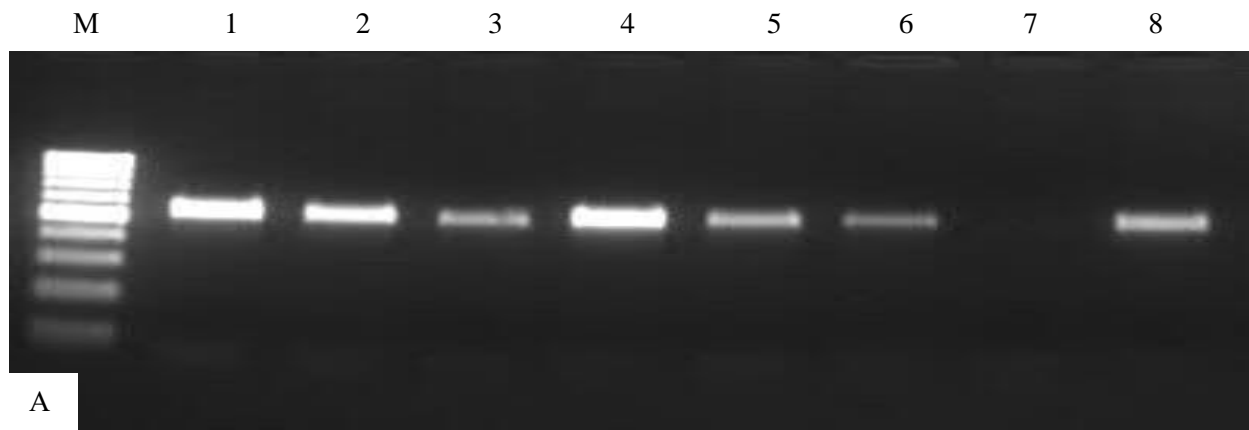
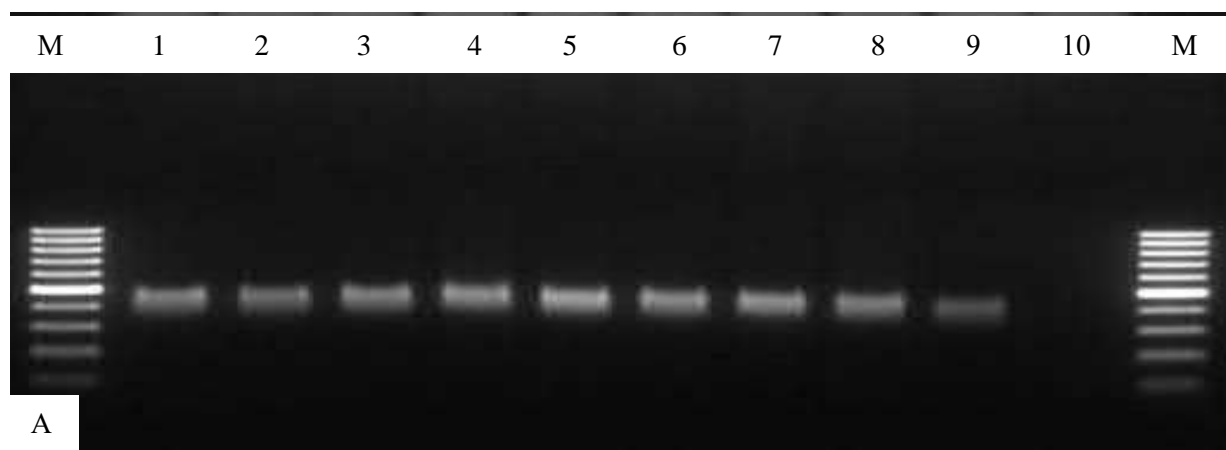


Рисунок 16 – Электрофореграммы результатов оценки специфичности разработанной методики ПЦР для выделения Грам+ микроорганизмов из чистой культуры выросших микроорганизмов

Примечание: А. с праймерами DG74F - 143R: М - маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1-6 - ДНК Грам+ микроорганизмов; 7 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 8 – положительный контроль (ДНК штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665) Б. с праймерами DG74F – 68dR: М – маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1-6 – ДНК Грам+ микроорганизмов; 7 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 8 – ДНК штамма *B. pertussis*





А



Б

Рисунок 17 – Электрофореграммы результатов оценки специфичности разработанной методики ПЦР для выделения Грам- микроорганизмов из чистой культуры выросших микроорганизмов

Примечание: А. с праймерами DG74F - 68dR: М – маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1-8 – ДНК Грам- микроорганизмов; 9 – положительный контроль (ДНК штамма *B. pertussis*); 10 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); Б. с праймерами DG74F - 143R: М - маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1-8 – ДНК Грам- микроорганизмов; 9 – ДНК штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665; 10 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

### 2.7.2. Разработка nested-ПЦР для целевой индикации и идентификации микроорганизмов в лейкоцитарном слое проб крови

Материалом для дальнейшего исследования служил лейкоцитарный слой пробы крови для индикации и идентификации Грам-принадлежности микроорганизмов. Для повышения чувствительности определения ДНК бактерий применили методику nested-ПЦР с двумя парами праймеров, которые предварительно были сконструированы с помощью компьютерной программы BLAST на основании анализа нуклеотидных последовательностей референсных штаммов (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

В качестве клинических образцов использован лейкоцитарный слой пробы крови. Схема постановка nested-ПЦР с использованием лейкоцитарного слоя пробы крови представлена на рисунке 18.

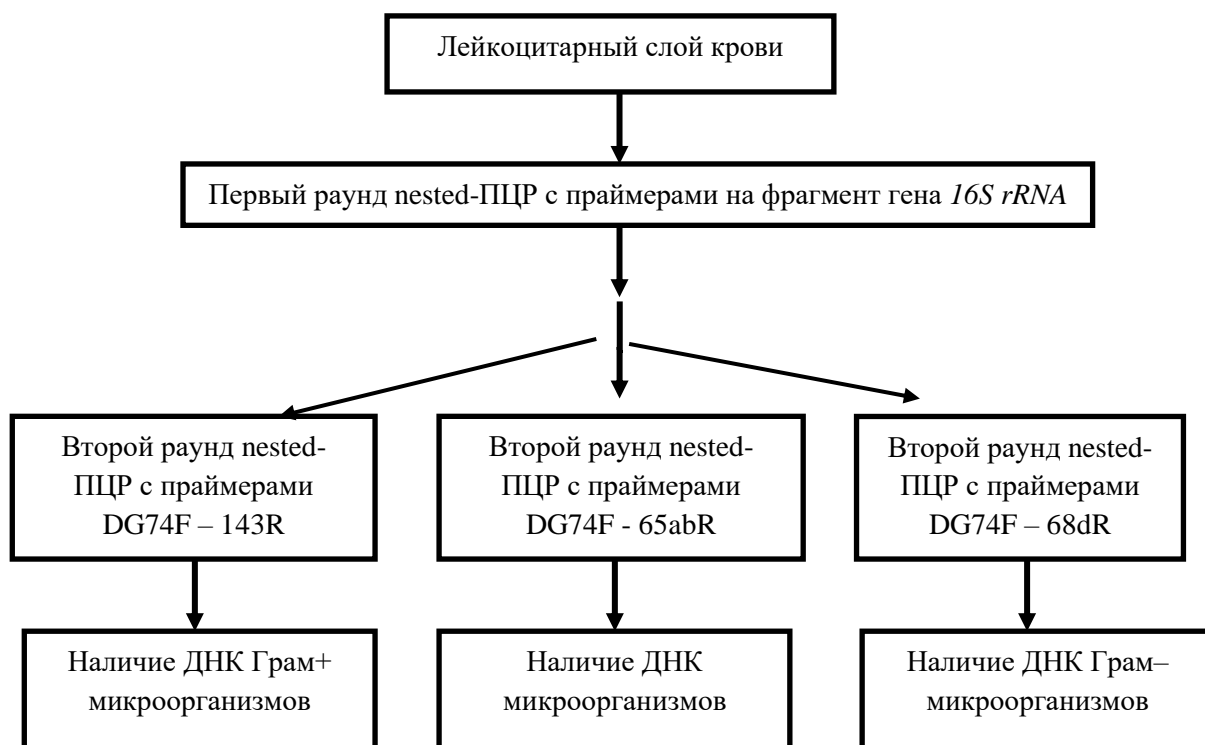


Рисунок 18 – Схема постановки nested-ПЦР для индикации и идентификация микроорганизмов в лейкоцитарном слое пробы крови

Первый раунд nested-ПЦР для индикации микроорганизмов в лейкоцитарном слое проводили с применением наружных праймеров на определение фрагмента гена *16S rRNA*:

27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

1492R 5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Реакционная смесь: 10x Taq buffer with KCl и 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP mix (2 mM each) (Thermo Fisher Scientific, США), 0,1 мкМ прямого и 0,1 мкМ обратного праймеров, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, США) и 2 мкл выделенной ДНК из лейкоцитаного слоя крови в окончательном объеме 30 мкл. Условия амплификации: 95° С – 5 мин; 95° С – 30 сек, 65° С – 30 сек, 72° С – 2 мин (30 циклов); 72° С – 5 мин. Электрофорез проводили как описано выше (Рисунок 19).

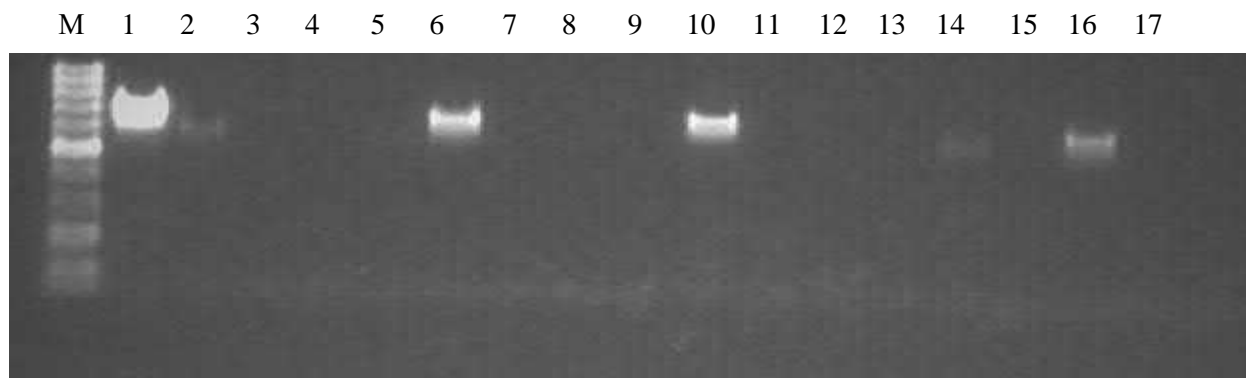


Рисунок 19 – Результаты постановки nested-ПЦР для индикации ДНК микроорганизмов из лейкоцитарного слоя (первый раунд)

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)

На рисунке 19 полученные положительные результаты амплификации свидетельствуют о наличии в пробах лейкоцитарного слоя крови ДНК микроорганизмов. Первый раунд постановки nested-ПЦР смог 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 5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3' и 65abR 5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAY-3' [190, 227]. Реакционная смесь: 10x Taq buffer with KCl и 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP mix (2 mM each) (Thermo Fisher Scientific, США), 0,1 мкМ прямого и 0,1 мкМ обратного праймеров, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, США) и 2 мкл ампликонов после первого раунда nested-ПЦР в окончательном объеме 30 мкл. Режим амплификации: 95° С – 5 мин; 95° С – 30 сек, 65° С – 30 сек, 72° С – 2 мин (30 циклов); 72° С – 5 мин. Ожидаемый размер продукта – 400 п.н. Электрофорез проводили при условиях, описанных выше (Рисунок 20).

Постановка второго раунда nested-ПЦР с праймерами DG74F-65abR позволила выявить бактериальные ДНК в концентрации  $10^3$  и показать высокую чувствительность ПЦР для диагностики микроорганизмов в лейкоцитарном слое.

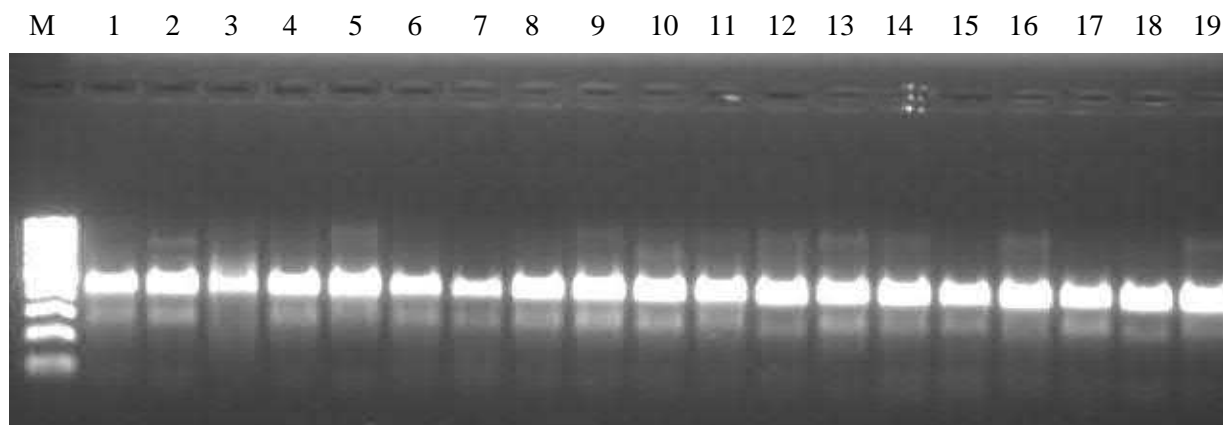


Рисунок 20 – Электрофореграмма результатов амплификации nested-ПЦР для индикации ДНК микроорганизмов из лейкоцитарного слоя с праймерами DG74F-65abR (второй раунд)

Примечание: М - маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1–19 - ДНК микроорганизмов

Следующий этап в диагностике микроорганизмов в лейкоцитарном слое расширен за счет определения Грам-принадлежности обнаруженных микроорганизмов. Для идентификации Грам+ микроорганизмов из лейкоцитарного слоя второй раунд nested-ПЦР проводили с помощью внутренних праймеров [190, 227]:

DG74F 5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3'

143R 5'-GAYGACGTCAARTCMTCATGC-3'

Реакционная смесь: 10× Taq buffer with KCl и 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP mix (2 mM each) (Thermo Fisher Scientific, США), 0,1 мкМ прямого и 0,1 мкМ обратного праймеров, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, США) и 2 мкл ампликонов после первого раунда nested-ПЦР в окончательном объеме 30 мкл. Режим амплификации: 95° С – 5 мин; 95° С – 30 сек, 65° С – 30 сек, 72° С – 2 мин (30 циклов); 72° С – 5 мин. Электрофорез проводили при тех же условиях. Ожидаемый размер продукта – 400 п.н. (Рисунок 21).

Положительные результаты, полученные во втором раунде nested-ПЦР, свидетельствуют о наличии в пробах лейкоцитарного слоя крови ДНК Грам+ микроорганизмов.

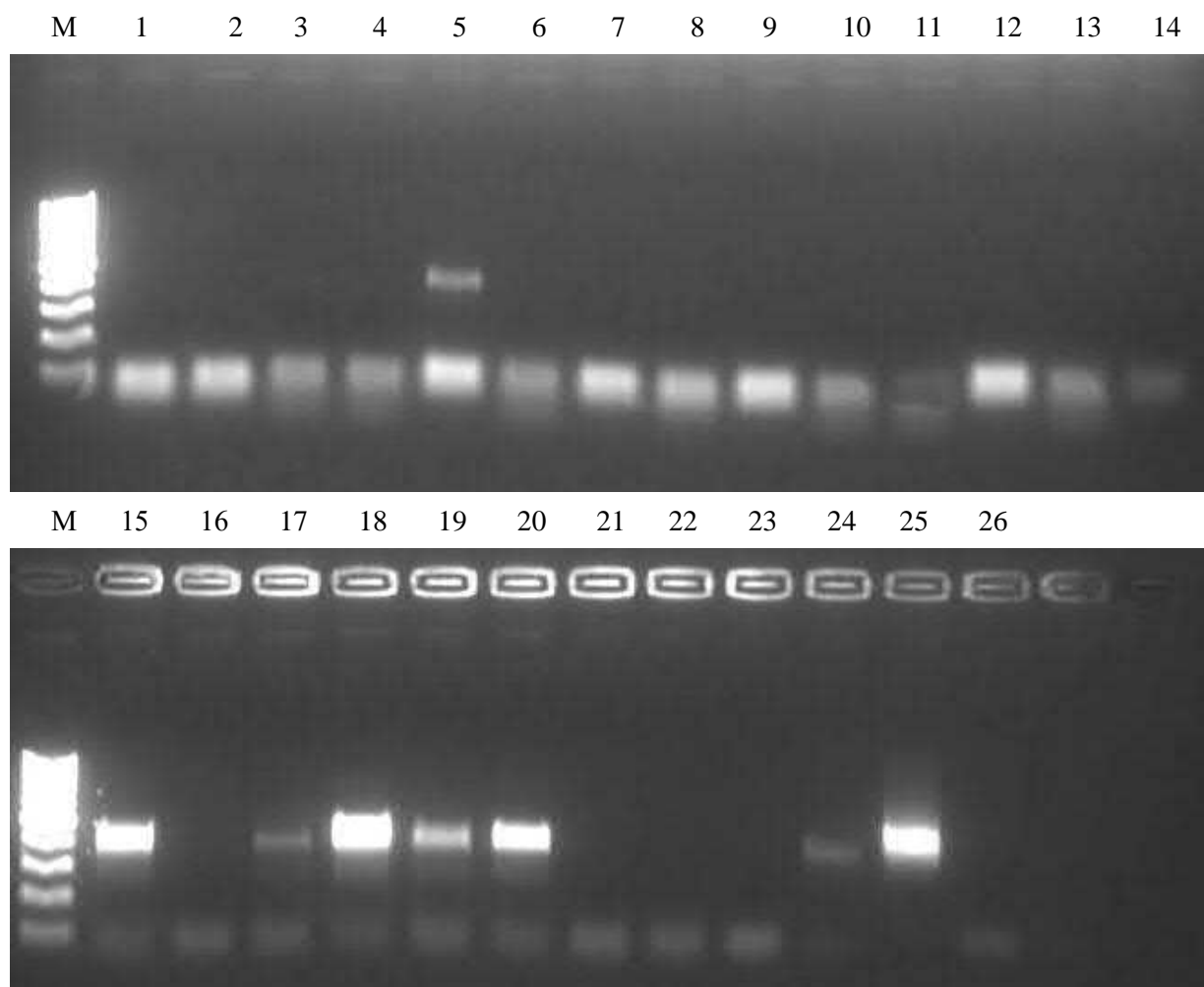


Рисунок 21 – Результаты постановки nested-ПЦР для идентификации ДНК Грам+ микроорганизмов из лейкоцитарного слоя крови с праймерами DG74F-143R (второй раунд)

Примечание: М - маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 21, 22, 23 - отрицательные образцы; 5, 15, 17, 18, 19, 20, 24 - ДНК Грам+ микроорганизмов; 25 - положительный контроль (ДНК штамма *S. diphtheriae* биовара *gravis* № 665), 26 - отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

Для идентификации Грам– микроорганизмов из лейкоцитарного слоя второй раунд nested-ПЦР проводили с помощью внутренних праймеров [190, 227]:

DG74F 5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3' и

68dR 5'-AYGACGTCAAGTCMTCATGG-3'

Реакционная смесь: 10x Taq buffer with KCl и 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP mix (2 mM each) (Thermo Fisher Scientific, США), 0,1 мкМ прямого и 0,1 мкМ обратного праймеров, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, США) и 2 мкл ампликонов после первого раунда nested-ПЦР в окончательном объеме 30 мкл. Режим амплификации: 95° С – 5 мин; 95° С – 30 сек, 65° С – 30 сек, 72° С – 2

мин (30 циклов); 72° С – 5 мин. Электрофорез проводили при тех же условиях. Ожидаемый размер продукта – 400 п.н. (Рисунок 22).

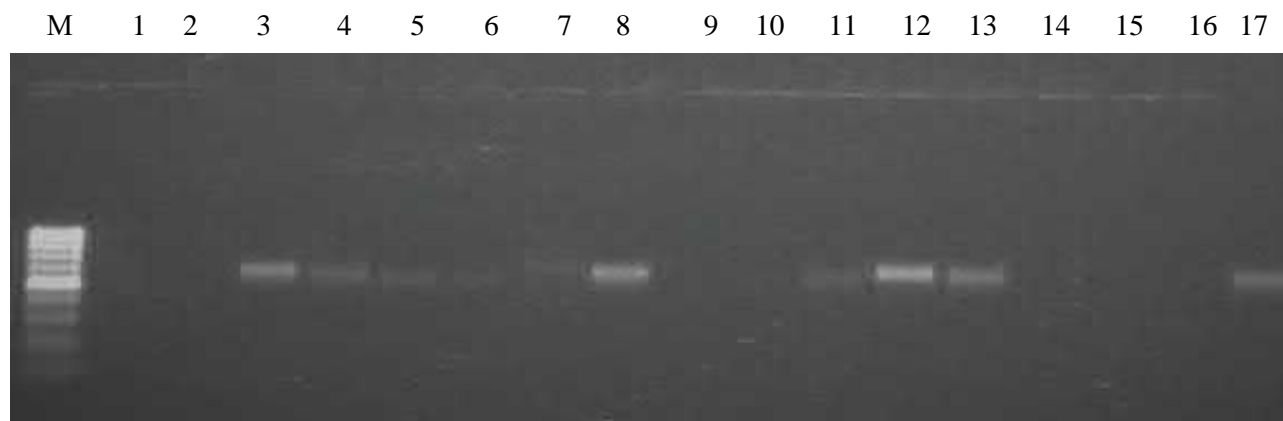


Рисунок 22 – Результаты постановки nested-ПЦР для идентификации ДНК Грам-микроорганизмов из лейкоцитарного слоя крови с праймерами DG74F-68dR (второй раунд)

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

Положительные результаты, полученные во втором раунде nested-ПЦР, свидетельствуют о наличии в пробах лейкоцитарного слоя крови ДНК Грам-микроорганизмов.

Итак, первый раунд постановки nested-ПЦР позволял выявлять ДНК микроорганизмов в концентрации  $10^4$ – $10^5$  степени. Проведение второго раунда nested-ПЦР со специфическими праймерами на Грам+ / Грам- микроорганизмы позволял выявить ДНК в концентрации  $10^3$ – $10^4$  степени непосредственно из клинического материала – 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 получен только в одном образце. Во втором раунде положительный результат получен в 25 пробах, что свидетельствовало о наличии ДНК микроорганизмов в концентрации  $10^3$ , 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.

Таким образом, метод молекулярно-генетического исследования микроорганизмов в лейкоцитарном слое позволяет выявлять и идентифицировать ДНК микроорганизмов в крови в концентрации  $10^3$ – $10^4$  степени.

## **2.8. Концептуальные принципы культуромики и их роль в повышении эффективности микробиологических исследований крови**

Культуромика – метод высокой эффективности получения культуры микроорганизма в силу конструирования разных моделей условий для жизнедеятельности и роста микроорганизмов в искусственных условиях выращивания. Культуромика предусматривает использование молекулярно-генетических, классических бактериологических (в т. ч. биохимических) методов и MALDI-ToF-масс-спектрометрии для идентификации выделенных микроорганизмов [237]. Культуромика характеризует достоинство и возрождение культурального метода, новый подход к выделению возбудителя перед другими методами при диагностике любого инфекционного заболевания. Принципы микробиологической культуромики конкретно для гемокультуры включают применение всех возможных условий для культивирования крови с целью максимальной диагностики ИК. В принципы разных условий культивирования входят: время суток взятия пробы крови, количество проб крови, оптимальный объем крови и среды для выдерживания соотношения 1:10–1:20, СМС с ростовыми добавками, анаэробные условия гемокультивирования, применение экспресс-метода получения гемокультуры, идентификация выделенных микроорганизмов с помощью масс-спектрометрических и молекулярно-генетических технологий. В литературе опубликованы попытки экспресс-методов для гемокультуры, модификации и посева лизируемой крови.

Нами предпринята попытка перенести приемы культуромики в исследование крови с целью оптимального получения гемокультур. Инновационный подход на модели гемокультивирования включает 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 субкультивировании; 6) СМС для посева и субкультивирования; 7) экспресс-метод посева лейкоцитарного слоя пробы крови; 8) СМА для посева лейкоцитарного слоя; 9) анализ полимикробных гемокультур; 10) применение MALDI-ToF-масс-спектрометрии; 11) применение молекулярно-генетических методов.

Первоначально примененным принципом был посев 10,0 мл цельной крови в анаэробный флакон, содержащий 200 мл сердечно-мозговой среды. В исследование было включено 1594 пробы крови 848 госпитальных терапевтических больных. Гемокультуру получали в 38,3% случаев с выделением аэробов (89,4%), анаэробов (9,4%), грибов (1,2%). Факультативно-анаэробные возбудители ИК давали рост чаще в анаэробных условия культивирования крови (56,5%), чем в аэробных (43,5%). Анаэробные условия культивирования обеспечили выделение дополнительно 385 штаммов аэробных и 121 штамма анаэробных микроорганизмов. Анаэробные условия, выдержанные на протяжении всего цикла гемокультивирования, позволили дополнительно выделить из крови 506 штаммов микроорганизмов, включая факультативно-анаэробных и строгих анаэробных микроорганизмов, которые дали рост только в анаэробных условиях.

Оценили роль питательной среды в выделении микроорганизмов из крови на 260 пробах крови при параллельном посеве на разработанную СМС и применяемую тиогликолевую среду (ТГС). Аэробные микроорганизмы дали рост на СМС в 2,4 раза активнее, чем на ТГС (22,7% и 9,6% соответственно), анаэробные – на ТГС роста не дали. СМС эффективнее ТГС в 2,3 раза для получения гемокультур (37,6% и 16,7% соответственно) и в 4,3 раза для роста полимикробных гемокультур (7,3% и 1,7% соответственно).

Далее мы оценили выделение микроорганизмов при параллельном посеве цельной крови (классический метод) и посеве лейкоцитарного слоя (экспрессный 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 экспресс-метода получения гемокультур превышала результаты классического



метода в 2,5 раза.

Современные масс-спектрометрические и молекулярно-генетические методы идентифицируют широкий спектр микроорганизмов, применение этих методов позволило идентифицировать две культуры: *Rothia mucilaginosa* и *Brevibacillus bostelensis*, полученные из крови человека.

Таким образом, применение принципов и модулей культуромики в качестве комплексного подхода к микробиологическому исследованию крови повысило эффективность получения гемокультуры в диагностике ИК. Молекулярно-генетический метод идентификации позволил расширить спектр выделенных возбудителей.

Получение гемокультур ставит перед клиницистами проблему грамотной интерпретации полученных результатов. Мнения многих исследователей противоречивы. В нашу задачу входило оптимизировать клиническую значимость выделенных микроорганизмов с учетом клинических симптомов.

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

В настоящее время выросла роль условно-патогенных микроорганизмов в патогенезе ИК, поэтому следует учитывать выделение условно-патогенного микроорганизма в одном инокулированном кровью флаконе, патогенное значение микроорганизма и наличие клинических признаков заболевания [31, 366]. В группу ведущих возбудителей госпитальной и внегоспитальной Б входят *S.epidermidis*, *S.aureus*, *E.coli*, грибы, обладающие широким набором генов устойчивости [38, 81, 166, 309]. *S.epidermidis* часто является фактором хронических заболеваний в виду своих биологических особенностей. При циркуляции данного вида стафилококка в крови: продуцируются противовоспалительные цитокины, внутриклеточный полисахаридный адгезин снижает фагоцитоз, освобождённые компоненты комплемента не повышают фагоцитарный лизис [146, 285]. Анаэробные грамположительные неспорообразующие палочки способны вызывать эндокардит, эндофтальмит, артрит. Придают клиническое значение выделению *Cutibacterium acnes* в двух гемокультурах или в одной при наличии клинических признаков

воспаления. Этот микроорганизм имеет низкий риск летальности, но его патогенетическая потенция вызывает ИК у пациентов с предшествующими инвазивными процедурами [299].

Существуют разные подходы для определения клинической значимости выделенных микроорганизмов (Таблица 17).

Таблица 17 – Подходы к определению клинической значимости эпизодов ИК

Группы	Критерии значимости	Ссылки
1	Выделение патогенных микроорганизмов: <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Центр по Контролю над Заболеваемостью в США (CDC), Garner J.S. et al., 1988.
2	Выделение условно-патогенных или сапрофитных микроорганизмов из открытых биотопов человека более, чем из 2-х проб крови, взятых в течение суток при наличии симптомов инфекции	
3	Выделение микроорганизмов из одной пробы крови при наличии симптомов инфекции и связано с катетеризацией сосудов	
4	Остальные варианты выделения микроорганизмов из крови	
1	Высокий уровень значимости имеет выделение патогенных микроорганизмов: сальмонеллы, грамотрицательные энтеробактерии, менингококки, все виды стрептококков	ВОЗ (клиническая значимость)
2	Средний уровень значимости имеет выделение микроорганизмов: гемофильная палочка, бактероиды, синегнойная палочка	
3	Низкий уровень значимости имеет выделение микроорганизмов: дрожжевые грибы, другие неферментирующие грамотрицательные палочки	
1	«Вероятная клиническая значимость» - получение роста микроорганизмов более, чем в 2-х образцах крови в течение суток	По количеству полученных гемокультур
2	«Сомнительная клиническая значимость» - получение роста микроорганизмов менее, чем в 2-х образцах крови в течение суток	
1	При выделении патогенного микроорганизма в одном посеве крови, эпизод бактериемии «значимый».	Багирова Н. С., 2015
2	Выделение условно-патогенных (обитатель кожи и слизистой) или сапрофитных (обитатель окружающей среды) микроорганизмов не менее 2-х раз в течение суток, эпизод бактериемии «значимый».	
3	Все остальные ситуации - эпизод бактериемии «незначимый»	
1	Выделенный патоген не связан с инфекцией другого места	CDC/NHSN, 2014
2	Пациент имеет один из следующих симптомов: лихорадка, озноб, гипотензия. Положительные лабораторные результаты не связаны с инфекцией другого места. Обычные кожные комменсалы выделяют из 2-х или более гемокультур, полученных из отдельных венопункций. Для единичных гемокультур необходим клинический симптом.	ECDC, 2015. UAI-Net ICU protocol version 1.02.
1	Одна положительная гемокультура имеет известный патоген	
2	Две положительные гемокультуры с обычными кожными контаминантами. Две отдельные пробы, взятые в течение 48 часов. Имеется 1 из следующих симптомов (лихорадка, сниженная температура тела, озноб).	
3	Одна положительная гемокультура с кожными контаминантами у пациента с центральным венозным катетером	

Из таблицы 17 видно, что для определения клинической значимости полученных гемокультур используются разные подходы: качественные – выделение патогенного или клинически значимого микроорганизма в одной пробе крови и количественные – выделение условно-патогенных или сапрофитных в двух пробах крови в течение суток. Разнообразные подходы оценки клинической значимости гемокультур не являются унифицированными, не затрагивают эпизоды полимикробных ИК, не в полной мере учитывают клинические симптомы инфекции.

Нами разработан клинико-лабораторный подход к оценке клинической значимости полученных мономикробных и полимикробных гемокультур при ИК у терапевтических больных, который позволяет учитывать видовые, количественные, полимикробные характеристики гемокультур и клинические симптомы в совокупности, как комплексное состояние. Разработанные критерии оценки клинической значимости эпизодов ИК представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Разработанные группы клинической значимости эпизодов ИК

Группы клинической значимости эпизодов ИК			
Абсолютная			Вероятная
1	2	3	4
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, и при наличии клинических симптомов инфекционного процесса

В таблице 18 видно, что критерии составлены для 4-х вариантов эпизодов ИК. «Абсолютная клиническая значимость» объединяет три группы и «Вероятная клиническая значимость» – для одной. Для полимикробных ИК критерии вышеперечисленных групп сохраняются. В клинические симптомы внесены показатели: субфебрильная или фебрильная температура тела, озноб, возраст, диагноз пациента, очаг инфекции, маркеры ИК. У кардиологических пациентов определенные диагнозы рекомендуют микробиологическое исследование крови при наличии или отсутствии клинических симптомов (ИЭ, ревматизм, врожденные пороки сердца). Полученные результаты представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Клиническая значимость эпизодов мономикробная ИК у кардиологических пациентов, n (%)

Клиническая значимость эпизодов мономикробной ИК (n=277)							
Абсолютная, n=259 (93,5%)					Вероятная, n=18 (6,5%)		
1 гр.	2 гр.	3 гр.			4 гр.		
пат. м/о	УПМ*	УПМ** (t <sup>0</sup> )	УПМ*** (д-з)	УПМ**** (очаги)	УПМ** (t <sup>0</sup> )	УПМ*** (д-з)	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 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 в организме

Как показано в таблице 19, в большинстве случаев эпизоды мономикробной ИК имели «абсолютное» клиническое значение (93,5%) и в 6,5% случаев – «вероятное». Наибольшее подтверждение клинической значимости эпизодов ИК выявлено у пациентов с диагнозами: ИЭ, врождённый порок сердца, ревматизм, лихорадочное состояние. Причинами ИК в 21,2% случаев были патогенные микроорганизмы. Половина эпизодов ИК с низкой долей значимости связана с диагнозом, предполагающим наличие ИК (50,0%) и лихорадочным состоянием (44,4%).

«Абсолютную» клиническую значимость имеют мономикробные эпизоды ИК в случае: выделение условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) из одной пробы крови у пациентов с диагнозами, предполагающими наличие инфекции в крови, с лихорадочным состоянием или выделением патогенного микроорганизма (32,8%, 31,7% и 21,2% соответственно). Клиническая значимость полимикробной ИК представлена в таблице 20.

Таблица 20 – Клиническая значимость эпизодов полимикробной ИК у кардиологических пациентов n (%)

Клиническая значимость эпизодов полимикробной ИК (n=73)							
Абсолютная n=62 (84,9%)					Вероятная n=11 (15,1%)		
1 гр.	2 гр.	3 гр.			4 гр.		
пат. м/о	УПМ*	УПМ** (t <sup>0</sup> )	УПМ*** (д-з)	УПМ**** (очаги)	УПМ** (t <sup>0</sup> )	УПМ*** (д-з)	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 инфекционного диагноза; \*\*\*\* – один УПМ при наличии очага инфекции

Как видно из таблицы 20, в большинстве случаев эпизоды полимикробной ИК имели «абсолютное» клиническое значение (84,9%) и в 15,1% случаев – «вероятное». Эпизоды полимикробной ИК имели абсолютное клиническое значение при выделении из крови патогенных микроорганизмов (40,3%) и выделении УПМ на фоне лихорадки (27,4%). Эпизоды полимикробной ИК у пациентов с некоторыми кардиологическими диагнозами чаще имели «вероятную» клиническую значимость (63,6%).

«Абсолютную» клиническую значимость имели полимикробные эпизоды ИК в случае выделения патогенных микроорганизмов, УПМ из одной пробы крови у пациентов с лихорадкой и одного вида УПМ из двух разных проб крови, взятых через 30 мин (40,3%, 27,4% и 21,0% соответственно).

При ИК один и тот же микроорганизм, выделенный в двух пробах, взятых через 30 мин, расценивали как один эпизод ИК, а в разные дни – как отдельные эпизоды. Возбудители ИК с «абсолютной» и «вероятной» степенью клинической значимости представлены в таблицах 21, 22, 23 и 24.

Таблица 21 – Микроорганизмы 1-й группы эпизодов ИК

Микроорганизмы	Количество (n=67)	%
Грамположительные кокки	21	31,3
<i>S. aureus</i>	11	57,1
<i>E. faecalis</i>	7	10,4
<i>Streptococcus spp.</i>	3	4,5
Грамотрицательные палочки	26	38,8
<i>S. enteritidis</i>	1	3,8
<i>E. coli</i>	11	42,3
Другие грамотрицательные палочки сем. <i>Enterobacteriaceae</i>	10	38,5
Неферментирующие грамотрицательные палочки	4	15,4
Грамположительные бесспорные палочки	6	9,0
Анаэробные микроорганизмы	9	13,4
Грибы	5	7,5

Из таблицы 21 видно, что в 1-й группе клинически значимых возбудителей ИК, относящихся к патогенным микроорганизмам, грамотрицательные палочки выделялись немного чаще (38,8%), чем грамположительные кокки (31,3%), анаэробные микроорганизмы – в 13,4% и грибы – в 7,5% случаев. Среди грамположительных кокков лидировал *S.aureus* (57,1%), реже – энтерококки (10,4%),

в группе грамотрицательных палочек преобладала *E.coli* (42,3%). Возбудители ИК следующей группы по клинической значимости представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Микроорганизмы 2-й группы эпизодов ИК

Микроорганизмы	Количество (n=26)	%
Грамположительные кокки	21	80,8
<i>S. epidermidis</i>	17	81,0
<i>S. haemolyticus</i>	1	4,8
<i>S. mitis</i>	3	14,3
Грамположительные споровые палочки	5	19,2
<i>B. subtilis</i>	2	40,0
<i>B. cereus</i>	3	60,0

Из таблицы 22 видно, что во 2-й группе клинически значимых возбудителей ИК были УПМ, выросшие в двух пробах крови, взятых из разных мест с интервалом в 30 мин, что характерно для длительной циркуляции микроорганизмов в кровотоке. В данной группе преобладали грамположительные кокки (80,8%), реже – грамположительные споровые палочки (19,2%). Следующая группа возбудителей ИК представлена в таблице 23.

Таблица 23 – Микроорганизмы 3-й группы эпизодов ИК на фоне лихорадки

Микроорганизмы	Количество (n=82)	%
Грамположительные кокки	61	74,4
<i>S. epidermidis</i>	34	55,7
<i>S. haemolyticus</i>	10	16,4
Другие коагулазонегативные стафилококки	3	4,9
<i>S. mitis</i>	13	21,3
<i>S. mutans</i>	1	1,6
Грамположительные бесспорные палочки	8	9,8
Грамположительные споровые палочки	1	1,2
Грамотрицательные кокки	1	1,2
Анаэробные микроорганизмы	11	13,4

Из таблицы 23 видно, что рост в одной пробе крови только УПМ в 3-й группе эпизодов ИК у пациентов с лихорадочным состоянием даёт основание определять выделенные микроорганизмы в роли возбудителей и оценивать клиническую значимость эпизодов ИК. В этой группе преобладали грамположительные кокки (74,4%), среди которых лидировали *S.epidermidis* (55,7%) и *S.mitis* (21,3%). Следующая группа значимых выделенных микроорганизмов представлена в таблице 24.

Таблица 24 – Микроорганизмы 3-й группы эпизодов ИК у пациентов с «инфекционными» диагнозами

Микроорганизмы	Количество (n=85)	%
Грамположительные кокки	62	72,9
<i>S.epidermidis</i>	35	56,5
<i>S.haemolyticus</i>	12	19,4
Другие коагулазонегативные стафилококки	5	8,1
<i>S. mitis</i>	8	12,9
<i>S.mutans</i>	2	3,2
Грамположительные бесспорные палочки	10	11,8
Грамположительные споровые палочки	2	2,3
Анаэробные микроорганизмы	10	11,8
Грибы	1	1,2

В таблице 24 подобраны эпизоды ИК у пациентов 3-й группы с кардиологическими «инфекционными» диагнозами и с ростом УПМ в одной пробе крови. Преобладали грамположительные кокки (72,9%), чаще высеивали *S.epidermidis* (56,5%), реже – *S.haemolyticus* (19,4%) и *S.mitis* (12,9%).

Таким образом, для определения клинической значимости положительных гемокультур при ИК кроме видовых и количественных характеристик микроорганизмов в полученных гемокультурах необходимо учитывать ведущие клинические симптомы системного воспаления (гипертермия или гипотермия тела, озноб, маркеры инфекции), основной диагноз, наличие очагов инфекции.

### Резюме

В нашем исследовании 10 мл цельной крови вносили в 200 мл жидкой сердечно-мозговой среды во флаконе для создания соотношения крови к среде 1:20, заправляли флакон инертным газом для получения анаэробных условий. У госпитальных больных с ИК на одного больного приходилось 2,5 пробы, у внегоспитальных больных – 1,4 пробы на одного пациента. Частота взятия пробы крови и увеличение количества проб крови не влияли на получение гемокультуры. Посев крови в два парных флакона с интервалом в 30 минут обеспечило получить рост микроорганизмов в 64,9% случаев. Гемокультуру у госпитальных больных получали в 38,3% случаев при использовании парных флаконов и у внегоспитальных пациентов – в 48,0% случаев, отбирая чаще одну пробу крови (73,2%), чем две (20,3%). Анаэробные условия культивирования обеспечили эффективный рост факультативно-анаэробных микроорганизмов. СМС обладает

более высокой чувствительностью по сравнению со средой СКС. СМА на основе сердечно-мозговой экстракта повысил ростовые свойства среды, расширил спектр выделяемых микроорганизмов. По данным зарубежных исследователей в автоматизированных системах субкультивирование отрицательных проб после 7 дней инкубации давало рост микроорганизмов в 0,2% случаев, в нашем случае – в 45,7% случаев. Во флаконах, инкубированных более 7 дней, дополнительно получили 200 гемокультур и 239 клинически значимых штаммов микроорганизмов из них. Экспресс-метод получения гемокультуры показал эффективную лабораторную диагностику ИК при взятии небольшого объема крови, минимального набора количества проб, сокращения времени получения результата, отсутствие необходимости закупать дорогие импортные гемокультуральные автоматизированные системы и флаконы к ним для микробиологического исследования крови. Мы оценили совпадение положительных находок при микроскопии с результатами получения положительных, оказалось, что 2/3 выросших микроорганизмов предварительно выявлялись при микроскопии мазка крови. При отрицательной гемокультуре в 61,3% случаев определяли микроорганизмы в крови микроскопически. Показано, что применение молекулярно-генетических технологий расширяет возможности индикации и идентификации микроорганизмов в крови. Разработанная методика nested-ПЦР из лейкоцитарного слоя пробы крови после первого раунда постановки позволяла выявлять ДНК микроорганизмов в концентрации  $10^4$ – $10^5$  степени и после второго раунда - в концентрации  $10^3$ – $10^4$  степени. Для определения клинической значимости положительных гемокультур при ИК необходимо учитывать клинические симптомы системного воспаления, основной диагноз и наличие очагов инфекции.



### **ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПРИ ИНФЕКЦИИ КРОВОТОКА**

В клинике терапевтических болезней возрастает роль инфекционной патологии. Известен круг заболеваний, при которых Б и Ф являются иногда единственными показателями патологии. Наличие клинических симптомов, гематологических и биохимических показателей воспаления, лабораторно подтвержденные Б и Ф подтверждают заболевание больного, как ИК.

Патогенетическая роль инфекции при терапевтических заболеваниях известна давно. Это: ИЭ, язвенная болезнь желудка, заболевания органов дыхания, инфекция суставов и кожи.

#### **3.1. Характеристика обследованных пациентов терапевтического профиля**

Клинико-эпидемиологическое наличие Б у терапевтических больных изучали на примере многопрофильной больницы [31], но роль инфекции как осложнения основного терапевтического заболевания не изучалась.

Внегоспитальная пневмония с летальностью в 20% является медицинской проблемой. Б осложняет пневмонию у внегоспитальных пациентов до 7% [147]. До 50,0% случаев пневмония встречается у лиц старше 65 лет. Микробиологическое исследование крови при внегоспитальной пневмонии имеет рекомендательный характер. Б диагностируется у 30% больных с лихорадкой, в 40,1% случаев - при наличии лихорадки менее одного дня. У женщин с внегоспитальным острым пиелонефритом назначают эмпирическую антимикробную терапию без посева крови. Б возникает после удаления зуба в 60% и после удаления зубных камней – в 88% случаев. Б присутствует у больных с патологией кожи в 15–19% случаев [272]. КАИК осложняет гемодиализ и стоит на втором месте по летальности при гемодиализе [16]. Транзиторная Б при любом заболевании приводит к метастатическому распространению инфекции по организму и возникновению септических осложнений до 5,26% случаев.

Для оценки эпизодов ИК у терапевтических госпитальных и внегоспитальных больных обследовано 1230 человек с подтвержденной ИК у 508 (41,3%) пациентов и

отрицательными посевами крови у 722 больных. Чаще диагностировали ИК у внегоспитальных (47,9%), чем у госпитальных пациентов (38,3%) ( $p=0,0016$ ). ИК чаще характеризовалась бактериальной (98,7%), чем грибковой (1,3%) этиологией ( $p < 0,001$ ). Среди бактериальных представителей преобладали грамположительные возбудители (91,9%). Эпизоды ГИК чаще имели грамотрицательную этиологию (78,4%), а ВГИК – грамположительную (36,9%). Грибковую ИК регистрировали больше при ГИК, чем при ВГИК (4/6 и 2/6 соответственно). Эпизоды ИК характеризовались полимикробностью (8,9%) с перевесом при ГИК (60,0%). Отмечали одинаковую частоту возникновения мономикробных и полимикробных ИК внутри группы госпитальных (64,4% и 60,0% соответственно,  $p=0,55$ ) и внегоспитальных больных (35,6% и 40,0% соответственно,  $p=0,56$ ). Такая ситуация характеризует хроническую циркуляцию микроорганизмов в кровотоке и осложняет подбор целевой антимикробной терапии. Эпизоды ИК при отдельных терапевтических заболеваниях представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Эпизоды ИК при различных терапевтических заболеваниях

Болезни систем организма	Госпитальные (n=325)		Вне госпитальные (n=183)		p
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Кровообращения	253 (77,8)	73,0-82,0	1 (0,5)	0,1-3,0	<0,001
Органов дыхания	3 (0,9)	0,3-2,7	18 (9,8)	6,3-15,0	<0,001*
Кожи и подкожной клетчатки	0 (0,0)	0,0-1,2	75 (41,0)	34,1-48,2	<0,001*
Мочеполовой	2 (0,6)	0,2-2,2	6 (3,3)	1,5-7,0	<0,001
Органов пищеварения	3 (0,9)	0,3-2,7	3 (1,6)	0,6-4,7	0,051*
Костно-мышечной	1 (0,3)	0,1-1,9	1 (0,5)	0,1-3,0	0,66*
Полости рта	0 (0,0)	0,0-1,2	26 (15,8)	9,9-20,0	<0,001*
Осложнения после пластической хирургии	0 (0,0)	0,0-1,2	9 (4,9)	2,6-9,1	<0,001*
Лихорадка неясного происхождения	63 (19,3)	15,4-24,0	44 (24,0)	18,4-30,7	0,21

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера или  $\chi^2$  с поправкой Йетса; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$

В таблице 25 показана частота осложнений ГИК при заболеваниях системы кровообращения (77,8%) и реже – при лихорадке неясного происхождения (19,3%). ВГИК сопутствовала заболеваниям кожи и подкожной клетчатки (41,0%), лихорадочному состоянию (24,0%), патологии полости рта (15,8%), заболеваниям органов дыхания (9,8%). Учитывая осложнения ИК у кардиологических больных, отдельно изучили эпизоды ИК у этих пациентов (Рисунок 23).

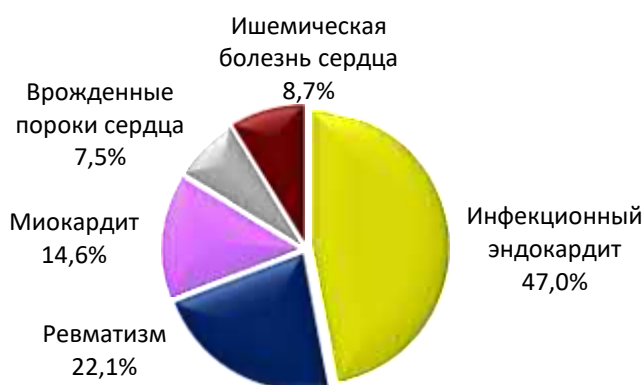


Рисунок 23 – Частота ИК при кардиологических заболеваниях

На рисунке 23 показана частота осложнений ИК при ИЭ (47,0%), ревматизме (22,1%), миокардите (14,6%), ишемической болезни сердца (ИБС) (8,7%) и врожденных пороках сердца (ВПС) (7,5%).

Таким образом, эпизоды ИК у 1230 терапевтических больных диагностировали в 41,3% случаев, включая ГИК (38,3%) и ВГИК (47,9%). Бактериальная этиология ИК случалась чаще (98,7%), чем грибковая (1,3%). ВГИК чаще характеризовалась грамположительными, а ГИК – грамотрицательными и грибковыми эпизодами. Мономикробная ИК регистрировалась в 91,1% и полимикробная – 8,9% случаев, различия в возникновении мономикробных и полимикробных ИК у госпитальных и внегоспитальных больных не отмечены. ГИК осложняла чаще заболевания системы кровообращения (77,8%), ВГИК чаще возникала при заболеваниях кожи и подкожной клетчатки (41,0%), полости рта (15,8%), реже – органов дыхания (9,8%). Среди кардиологических заболеваний ИК чаще диагностировали при ИЭ (47,0%), ревматизме (22,1%), миокардите (14,6%).

### 3.2. Клинические маркеры инфекции кровотока

К клиническим маркерам ИК относят клинические симптомы: повышенная температура тела и озноб [106, 184, 258].

#### 3.2.1. Температурная реакция и озноб у пациентов, как сопутствующие скрининговые маркеры изучения гемокультур

ИК, как инфекционное заболевание, сопровождается признаками воспаления, среди которых лидирует повышенная температура тела.

### *Температура тела*

Повышенная температура тела – это симптом воспаления и наличия ИК, но в настоящее время лабораторно подтвержденная Б часто протекает с нормальной (80%) или с субфебрильной температурой тела (17,4%) [333]. Может иметь место скрытая (окультурная) Б на фоне высокой температуры и без лечения ведет к развитию тяжелой бактериальной инфекции: пневмония, менингит, остеомиелит, сепсис. Высокая температура тела предсказывает Б у пожилых людей [347].

Клинические симптомы являются полезными на ранних этапах диагностики. При обследовании 1230 больных повышенная температура тела отмечалась при ИК (44,4%) и нормальная – без ИК (62,8%). У госпитальных и внегоспитальных больных повышенную температуру тела наблюдали с одинаковой частотой (61,8% и 61,7% соответственно;  $p=0,98$ ).

Для определения роли температуры тела в диагностике инфекции кровотока мы определяли операционные характеристики, к которым относят: чувствительность, специфичность, точность, прогностичность положительного результата, прогностичность отрицательного результата, предтестовая вероятность заболевания, частота ложноположительного и ложноотрицательного результатов [58]. Операционные характеристики повышенной температуры тела при ИК представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Операционные характеристика повышенной температуры тела при ИК (%)

Операционные характеристики	Результаты
Чувствительность	61,9
Специфичность	45,4
Прогноз положительного результата	44,4
Прогноз отрицательного результата	62,8
Точность	52,2
Частота ложноположительных результатов	54,6
Частота ложноотрицательных результатов	38,1

Из таблицы 26 видно, что чувствительность теста в 61,9%, специфичность – 45,4%. К послетестовой вероятности наличия ИК относится прогностическая ценность теста. Показатели её отображают вероятность наличия или отсутствия ИК при положительном или отрицательном результате теста. Прогноз

положительного результата показал вероятность ИК при повышенной температуре тела в 44,4% случаев. Прогноз отрицательного результата подтвердил отсутствие ИК при нормальной температуре тела в 62,8% случаев. Точность называют показателем диагностической эффективности, которая в нашем случае составляла 52,2%. Частота ложноположительных результатов преобладала в 1,4 раза над частотой ложноотрицательных результатов (54,6% и 38,1% соответственно) и показала, что повышенная температура тела маркирует ИК чаще, чем ее пропускает.

Наличие повышенной температуры тела у больных с разной терапевтической патологией представлено в таблице 27. Больные представлены двумя группами: больные с / без ИК.

Таблица 27 – Повышенная температура тела у пациентов с различными терапевтическими заболеваниями

Болезни систем организма	Группа больных (ИК+) (n=508)		Группа больных (ИК-) (n=722)		p
	Наличие лихорадки (n=314)		Наличие лихорадки (n=394)		
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Кровообращения	132 (42,0)	36,7-47,5	156 (39,6)	34,9-44,5	0,51
Органов дыхания	15 (4,8)	2,9-7,7	8 (2,0)	1,0-4,0	0,041
Кожи и подкожной клетчатки	38 (12,1)	8,9-16,1	32 (8,1)	5,8-11,2	0,080
Мочеполовой	4 (1,3)	0,5-3,2	3 (0,8)	0,3-2,2	0,76*
Органов пищеварения	3 (1,0)	0,3-2,8	9 (2,3)	1,2-4,3	0,28*
Костно-мышечной	1 (0,3)	0,1-1,18	3 (0,8)	0,3-2,2	0,80*
Полости рта	8 (2,5)	1,3-4,9	11 (2,8)	1,6-4,9	0,84
Осложнения после пластической хирургии	6 (1,9)	0,9-4,1	0 (0,0)	0,0-1,0	0,019*
Лихорадка неясного происхождения	107 (34,1)	29,1-39,5	172(43,6)	38,8-48,6	0,0087

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера или  $\chi^2$  с поправкой Йетса; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$

Из таблицы 27 видно, что наиболее часто повышение температуры тела при ИК наблюдали у больных с заболеваниями системы кровообращения (42,0%) и диагнозом ЛНП (34,1%). Реже – у больных с заболеваниями кожи и подкожной клетчатки (12,1%). При отсутствии ИК температура тела чаще повышалась у больных с ЛНП (43,6%), заболеваниями системы кровообращения (39,6%). Отдельно определили частоту повышенной температуры тела при кардиологических заболеваниях (Рисунок 24).



Рисунок 24 – Частота лихорадки при ИК у кардиологических больных

Среди кардиологических больных чаще поднималась температура тела при ИЭ (44,7%), ревматизме (18,9%), миокардите (16,7%), реже – у больных ИБС (11,4%) и ВПС (8,3%). Лихорадочное состояние чаще имеет инфекционную основу и связь активности лихорадки со свойствами возбудителей. Мономикробные эпизоды ИК состояли из бактерий (98,7%) и грибов (1,3%). Температура тела повышалась одинаково при грамположительных и грамотрицательных эпизодах ИК (60,9% и 67,6% соответственно,  $\chi^2=0,63$ ,  $p=0,43$ ), при мономикробной и полимикробной ИК (61,6% и 64,4% соответственно  $\chi^2 = 0,14$ ,  $p=0,71$ ).

Таким образом, при ИК температура тела повышалась в 44,4% случаях и с одинаковой частотой сопровождала больных госпитальных и негоспитальных. Чувствительность теста в 61,9% случаев и точность в 52,2% случаях показали клиническую значимость данного теста, как маркера ИК. Повышение температуры тела отмечали у больных ИК с заболеваниями системы кровообращения (42,0%), при ЛНП (34,1%), при заболеваниях кожи и подкожной клетчатки (12,1%). Среди кардиологических больных повышенную температуру чаще замечали у больных ИЭ (44,7%), ревматизмом (18,9%) и миокардитом (16,7%). Статистически нет разницы в частоте повышения температуры тела при грамположительной, грамотрицательной, мономикробной и полимикробной ИК.

### 3.2.2. Озноб – клинически значимый маркер

Озноб – физиологическая защитная терморегуляционная реакция организма, которая возникает в ответ на изменение обменных процессов в организме при инфекционно-воспалительном заболевании. Озноб часто сопровождает

субфебрилитет и является фактором предсказания Б чаще, чем повышенная температура тела. Озноб сопровождает лабораторно подтвержденную Б в 52,2% случаев [347].

При обследовании 1230 больных озноб регистрировали в 48,9% случаев. ИК сопровождалась наличием озноба чаще, чем его отсутствием (88,8% и 11,2% соответственно;  $p < 0,001$ ). Озноб является маркером ИК, т. к. чаще, в 4,3 раза, случался при ИК, чем без инфекции в крови (88,8% и 20,8% соответственно;  $p < 0,001$ ). При ГИК озноб отмечали чаще, чем при ВГИК (92,9% и 81,4% соответственно,  $p < 0,001$ ). Оценка озноба, как маркера ИК, представлена по операционным характеристикам (Таблица 28).

Таблица 28 – Операционные характеристики озноба при ИК (%)

Операционные характеристики	Результаты
Чувствительность	88,8
Специфичность	79,2
Прогноз положительного результата	75,1
Прогноз отрицательного результата	90,9
Точность	83,2
Частота ложноположительных результатов	20,8
Частота ложноотрицательных результатов	11,2

Из таблицы 28 видно, что чувствительность составила 88,8%, специфичность - 79,2% и точность - 83,2% случаев. Прогноз положительного результата оценил вероятность ИК при ознобе в 75,1%. Наличие озноба при разных терапевтических заболеваниях представлено в таблице 29.

Из таблицы 29 видно, что озноб чаще отмечали больные с заболеваниями системы кровообращения при ИК, чем при отсутствии микроорганизмов в крови (53,1% и 10,7% соответственно,  $p < 0,001$ ) и подтвердили наличие озноба, как маркера ИК, у больных с сердечной патологией. При ИК озноб возникал у больных с ЛНП (21,5%), заболеваниями кожи и подкожной клетчатки (12,6%). Частота озноба при кардиологических заболеваниях представлена на рисунке 25.

Таблица 29 – Озноб у пациентов с различной терапевтической патологией при ИК

Болезни систем организма	Группа больных (ИК+) (n=508)		Группа больных (ИК-) (n=722)		p
	Наличие озноба (n=451)		Наличие озноба (n=150)		
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Кровообращения	240 (53,1)	48,5-57,7	16 (10,7)	6,7-16,6	< 0,001
Органов дыхания	19 (4,2)	2,7-6,5	7 (4,7)	2,3-9,3	0,81
Кожи и подкожной клетчатки	57 (12,6)	9,9-16,0	43 (28,7)	22,0-36,4	< 0,001
Мочеполовой	7 (1,5)	0,8-3,2	3 (2,0)	0,7-5,7	0,99*
Органов пищеварения	3 (0,7)	0,2-1,9	7 (4,7)	2,3-9,3	0,0031*
Костно-мышечной	1 (0,2)	0,0-1,2	5 (3,3)	1,4-7,7	0,0044*
Полости рта	19 (4,2)	2,7-6,5	12 (8,0)	4,6-13,5	0,068
Осложнения после пластической хирургии	8 (1,8)	0,9-3,5	0 (0,0)	0,0-2,5	0,22*
Лихорадка неясного происхождения	97 (21,5)	17,9-25,5	57 (38,0)	30,6-46,0	< 0,001

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера или критерия  $\chi^2$  с поправкой Йетса; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$



Рисунок 25 – Структура кардиологических заболеваний с ознобом при ИК

На рисунке 25 видно, что наиболее часто отмечали озноб при ИЭ (47,1%), ревматизме (20,8%), миокардите (15,4%), реже – при ИБС (9,2%) и ВПС (7,5%). Озноб характерен для грамположительной и грамотрицательной ИК в равной степени (87,6% и 94,6% соответственно,  $p=0,21$ ). Озноб сопровождал 4 из 6 случаев грибковую ИК. Отметим высокую частоту наличия озноба при мономикробной и при полимикробной ИК (87,9% и 97,8% соответственно;  $p < 0,045$ ), что подтверждает диагностическую роль озноба при ИК.

Таким образом, озноб регистрировали у больных в 48,9% случаев и чаще при наличии ИК (88,8%), в т. ч. у госпитальных больных в 92,9% случаев. Озноб, как тест, имел чувствительность – 88, %, специфичность – 79,2 %, точность – 83,2 %.



Озноб чаще сопутствовал больным с заболеваниями системы кровообращения (53,1%), среди которых лидировали ИЭ, ревматизм, миокардит. Озноб у внегоспитальных пациентов часто отмечен при заболеваниях кожи и подкожной клетчатки. Озноб, как клинический маркер, с одинаковой высокой частотой отмечали при грамположительной, грамотрицательной, мономикробной и полимикробной ИК.

### **3.3. Другие маркеры риска инфекции кровотока**

Факторы риска способствуют развитию определенного заболевания, формированию и проявлению клинических симптомов. Существуют модифицируемые факторы риска, т. е. устранимые, и немодифицируемые, т. е. неустраиваемые, к которым относятся пол и возраст. Описано влияние пола и возраста на возникновение сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). К факторам риска развития ИК относят возраст пациентов, гендерные характеристики [6, 12, 85, 92, 95, 245, 248].

#### *Гендерные характеристики больных*

Пол относится к немодифицируемому фактору риска, учитывается при определении степени тяжести развития заболевания. При ИЭ показана повышенная частота поражения клапанов и более тяжелое течение заболевания у мужчин, чем у женщин [85].

Из общего количества больных (1230 человек), женщин было немного больше (55,7%), чем мужчин (44,3%), однако ИК диагностировали у мужчин и женщин в равных долях (42,0% и 40,7% соответственно;  $p=0,65$ ). Замечено, что ГИК преобладала у мужчин чаще, чем у женщин (51,1% и 48,9% соответственно), а ВГИК чаще регистрировали у женщин, чем у мужчин (65,6% и 34,4% соответственно;  $p < 0,001$ ).

Нами проанализирована связь гендерных показателей с различными терапевтическими заболеваниями (Таблица 30). Как видно из таблицы 30, эпизоды ИК зарегистрированы при заболеваниях системы кровообращения у мужчин чаще, чем у женщин (58,5% и 43,0% соответственно;  $p < 0,001$ ). При заболеваниях кожи и подкожной клетчатки женщины имели больше риска возникновения ИК, чем мужчины (18,6% и 10,0% соответственно;  $p=0,0069$ ). При ЛНП у мужчин и у

женщин ИК возникала в равной мере (20,5% и 21,1% соответственно).

Таблица 30 – Гендерные характеристики пациентов с ИК и различных терапевтических заболеваниях

Болезни систем организма	Мужчины (n=545)		Женщины (n=685)		p
	Наличие ИК (n=229)		Наличие ИК (n=279)		
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Кровообращения	134 (58,5)	52,0-64,7	120 (43,0)	37,3-48,9	< 0,001
Органов дыхания	7 (3,1)	1,5-6,2	14 (5,0)	3,0-8,2	0,27
Кожи и подкожной клетчатки	23 (10,0)	6,8-14,6	52 (18,6)	14,5-23,5	0,0069
Мочеполовой	3 (1,3)	0,4-3,8	5 (1,8)	0,8-4,1	0,94*
Органов пищеварения	2 (0,9)	0,2-3,1	4 (1,4)	0,6-3,6	0,87*
Костно-мышечной	3 (1,3)	0,4-3,8	0 (0,0)	0,0-1,4	0,18*
Полости рта	10 (4,4)	2,4-7,9	16 (5,7)	3,5-9,1	0,49
Осложнения после пластической хирургии	0 (0,0)	0,0-1,6	9 (3,2)	1,7-6,0	0,016*
Лихорадка неясного происхождения	47 (20,5)	15,8-26,2	59 (21,1)	16,7-26,3	0,86

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера или критерия  $\chi^2$  с поправкой остается; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$

Гендерные особенности ИК среди кардиологических больных представлены в таблице 31.

Таблица 31 – Гендерные особенности кардиологических больных при ИК

Заболевания органов кровообращения	Мужчины		Женщины		p
	Наличие ИК (n=134)		Наличие ИК (n=120)		
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Инфекционный эндокардит	67 (50,0)	41,7-58,3	51 (42,5)	34,0-51,4	0,23
Ревматизм	24 (17,9)	12,3-25,3	32 (26,7)	19,6-35,2	0,093
Миокардит	16 (11,9)	7,5-18,5	22 (18,3)	12,4-26,2	0,15
Врожденные пороки сердца	12 (9,0)	5,2-15,0	8 (6,7)	3,4-12,6	0,50
Ишемическая болезнь сердца	15 (11,2)	6,9-17,6	7 (5,8)	2,9-11,6	0,13

Из таблицы 31 видно, что при ИЭ чаще эпизоды ИК случались у мужчин, чем у женщин (50,0% и 42,5% соответственно). У женщин отмечали эпизоды ИК чаще (в 1,5 раза), чем у мужчин при ревматизме (26,7% и 17,9% соответственно) и миокардите (18,3% и 11,9% соответственно), у мужчин чаще (в 2 раза), чем у женщин – при ИБС (11,2% и 5,8% соответственно). По гендерным показателям пациенты с грамположительной и грамотрицательной ИК не имели значимых различий: мужчины (44,8% и 45,9% соответственно) и женщины (55,2% и 54,1% соответственно), (p=0,88). Гендерная структура пациентов с бактериальными и грибковыми эпизодами ИК была однородна (p=0,87). Распределение по полу

пациентов с мономикробной и полимикробной ИК также однородно ( $p=0,82$ ). В группе мужчин чаще возникала полимикробная, чем мономикробная ИК (46,7% и 44,9% соответственно), у женщин – мономикробная, чем полимикробная ИК (55,1% и 53,3% соответственно).

Таким образом, среди 1230 терапевтических больных ГИК чаще регистрировалась у мужчин (51,1%), ВГИК – у женщин (65,6%) ( $p < 0,001$ ). Заболевания системы кровообращения чаще осложнялись ИК у мужчин, чем у женщин ( $p < 0,001$ ). Женщины чаще мужчин в 1,9 раз страдали ИК при заболеваниях кожи и подкожной клетчатки и в 1,5 раза – при ревматизме и миокардите. У мужчин в 2 раза чаще, чем у женщин ИК осложняла ИБС. Гендерных значимых различий у пациентов среди грамположительной, грамотрицательной, мономикробной и полимикробной ИК не отмечено.

### ***Возраст – фактор риска***

С возрастом снижаются компенсаторные и иммунные возможности организма, существует большой риск развития Б у лиц в пожилом и старческом возрасте. В группе больных до 60 лет преобладает грамположительная Б (54,3%) над грамотрицательной (47,6%), летальность составляет 35,3% случаев. У больных старше 60 лет преобладает грамотрицательная Б (52,4%) над грамположительной (45,7%) с летальностью до 44,9% [91]. В случае *S.aureus* Б летальность больных в возрасте младше 60 лет составляла 41,9%, старше 60 лет – 60,6% случаев [125].

В нашем изучении все больные были распределены на 4 возрастные группы согласно новой возрастной классификации ВОЗ от 2017 года [6]: 1-я группа – от 10 до 44 лет (молодая), 2-я группа – от 45 до 60 лет (средняя), 3-я группа – от 61 до 75 лет (пожилая) и 4-я группа – от 76 до 90 лет (старческая). Все больные по возрастным группам представлены в таблице 32. Из таблицы 32 видно, что в молодой группе больных (с 10 до 44 лет) ИК встречалась чаще, чем в старческой (от 76 до 90 лет) (43,2% и 28,6% соответственно).

Таблица 32 – Распределение по возрастным группам госпитальных и внегоспитальных больных с ИК

Больные (n=1230)		Возрастные группы			
		1-я группа 10-44 лет (n=762)	2-я группа 45-60 лет (n=356)	3-я группа 61-75 лет (n=98)	4-я группа 76-90 лет (n=14)
Наличие ИК (n=508)	абс.	329	137	38	4
	%	43,2	38,5	38,8	28,6
	95% ДИ	39,7-46,7	33,6-43,6	29,7-48,7	11,7-54,6
Отсутствие ИК (n=722)	абс.	432	219	61	10
	%	56,7	61,5	62,2	71,4
	95% ДИ	53,3-60,3	56,4-66,4	51,3-70,3	45,4-88,3
		$\chi^2=3,62; p=0,30$			
Больные		1-я группа (n=329)	2-я группа (n=137)	3-я группа (n=38)	4-я группа (n=4)
Госпитальные (n=325)	абс.	193	100	28	4
	%	58,7	73,0	73,7	4/4
	95% ДИ	53,3-63,9	65,0-79,7	58,0-85,0	
Внегоспитальные (n=183)	абс.	136	37	10	0
	%	41,2	27,0	26,3	0/4
	95% ДИ	36,0-46,6	20,3-35,0	15,0-42,0	
		$\chi^2 = 10,36; p = 0,0056$			

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$

Средний и пожилой возраст больных (от 45 до 60 и от 61 до 75 лет) имели одинаковую частоту возникновения ИК (38,5% и 38,8% соответственно). ГИК возникала чаще, чем ВГИК, в 1,4 раза у лиц молодого, в 2,7 раза – у лиц среднего возраста, в 2,8 раза – у пожилых людей. Все пациенты старческого возраста перенесли ИК только в условиях стационара. Влияние возраста больных на возникновение эпизодов ИК при различных терапевтических заболеваниях представлено в таблице 33. Показано, что у больных 1, 2 и 3 возрастными группами ИК осложняла основные заболевания системы кровообращения (44,5%, 60,6% и 60,5% соответственно), возникала при заболеваниях кожи и подкожной клетчатки (17,6%, 10,9% и 5,3% соответственно) и ЛНП (21,2%, 19,0% и 23,7% соответственно). В старческой группе 50% случаев ИК приходилось на больных с ЛНП. ИК у пациентов трех возрастных групп с кардиологическими заболеваниями представлена на рисунке 26.

Таблица 33 – ИК у пациентов различных возрастных групп при заболеваниях разных систем организма

Возрастные группы	Болезни систем организма и ИК (n=508) (n/%)								
	1 – Кр	2 – Д	3 – К	4 – МП	5 – П	6 – КМ	7 – Р	8 – ХП	9 – Л
1 (n=329)	147 (44,5)	16 (4,8)	58 (17,6)	7 (2,1)	4 (1,2)	1 (0,3)	19 (5,8)	7 (2,1)	70 (21,2)
95% ДИ	39,3-49,9	3,0-7,7	13,8-22,0	1,0-4,3	0,5-3,1	0,1-1,7	3,7-8,8	1,0-4,3	17,1-25,9
2 (n=137)	83 (60,6)	4 (2,9)	15 (10,9)	1 (0,7)	1 (0,7)	0 (0,0)	5 (3,6)	2 (1,5)	26 (19,0)
95% ДИ	52,2-68,4	1,1-7,3	6,7-17,3	0,1-4,0	0,1-4,0	0,0-2,7	1,6-8,3	0,4-5,2	13,3-26,4
3 (n=38)	23 (60,5)	1 (2,6)	2 (5,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,6)	2 (5,3)	0 (0,0)	9 (23,7)
95% ДИ	44,7-74,4	0,5-13,4	1,5-17,3	0,0-9,2	0,0-9,2	0,5-13,4	1,5-17,3	0,0-9,2	13,0-39,2
4 (n=4)	1 (1/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	1 (1/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	2 (2/4)

Примечание: системы и заболевания обозначены цифрами и буквами: 1 – кровообращения (Кр), 2 – органов дыхания (Д), 3 – кожи и подкожной клетчатки (К), 4 – мочеполовой (МП), 5 – органов пищеварения (П), 6 – костно-мышечной (КМ), 7 – полости рта (Р), 8 – осложнения после хирургической пластики (ХП), 9 – лихорадка неясного происхождения (Л)

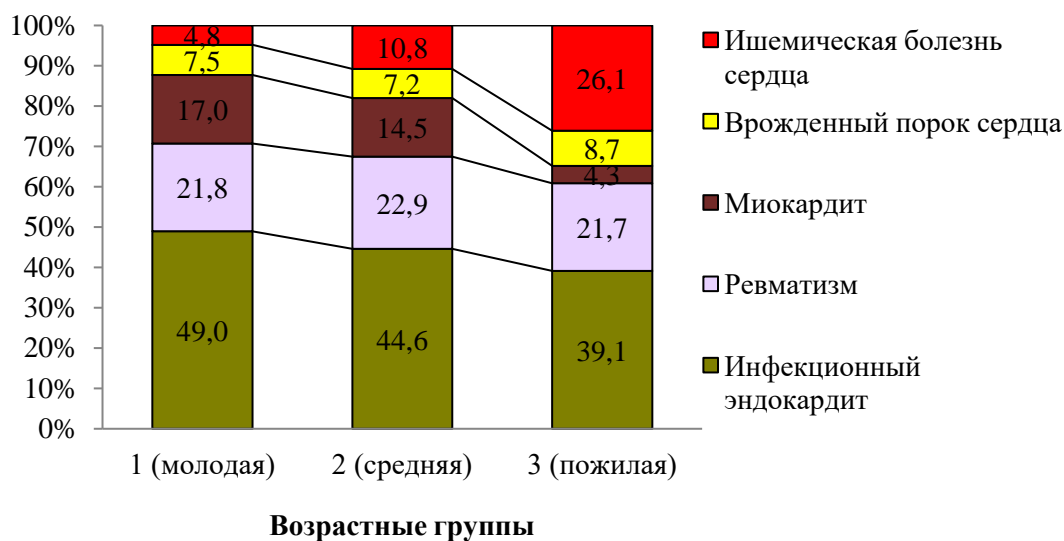


Рисунок 26 – ИК при кардиологических заболеваниях у пациентов трех возрастных групп

Как показано на рисунке 26, ИК возникала у больных трех возрастных групп при ИЭ (49,0%, 44,6% и 39,1% соответственно), ревматизме (21,8%, 22,9% и 21,7% соответственно), ВПС (7,5%, 7,2% и 8,7% соответственно). Чаще ИК случалась у больных молодого и среднего возраста при миокардите (17,0% и 14,5% соответственно). Отметим высокий уровень возникновения ИК в группе пожилых больных при ИБС (26,1%).

У молодых больных (10–44 лет) чаще возникала грамотрицательная ИК, чем

грамположительная (75,7% и 64,0%, соответственно). В средней (45–60 лет) и пожилой группах (61–75 лет) преобладали грамположительные ИК (27,6% и 7,8% соответственно). В старческой группе (76–90 лет) грамотрицательная ИК регистрировалась чаще в 10,8 раз, чем грамположительная ИК (5,4% и 0,5% соответственно). Грибковую ИК чаще выявляли в группах молодых (10–44 лет) и пожилых (61–75 лет) больных (83,3% и 16,7% соответственно). Во всех возрастных группах мономикробные и полимикробные ИК у пациентов были однородны. Частота возникновения полимикробной ИК у больных среднего возраста выше (в 1,3 раза), чем мономикробной (33,3% и 26,3%, соответственно).

Таким образом, роль возраста как фактора риска в возникновении ИК представлена:

В 1-й молодой группе (10–44 лет) больные ИК составляли 43,2%, включая госпитальных – 58,7% больных. ИК осложняла заболевания системы кровообращения (44,7%) и вызывала лихорадку (21,3%). Среди кардиологических больных ИК сопровождала ИЭ (21,9%) и ревматизм (9,7%) и характеризовалась грамположительной (81,8%), реже – грибковой (1,5%), чаще – моноинфекцией (91,8%).

Во 2-й средней группе (45–60 лет) больные ИК составляли 38,5%, включая госпитальных – 73,0%. ИК осложняла заболевания системы кровообращения (60,6%), сопровождала лихорадку (19,0%). ИК возникала при ИЭ (27,0%) и ревматизме (13,9%). ИК чаще имела возбудителей из грамположительных бактерий (84,7%) и была мономикробного характера (89,1%).

В 3-й пожилой группе (61–75 лет) больные ИК составляли 38,8%, включая госпитальных – 73,7% случаев. ИК осложняла заболевания системы кровообращения (60,5%), сопутствовала лихорадке (23,7%). ИК возникала при ИЭ (23,7%), ревматизме (13,2%) и ИБС (15,8%). Возбудители ИК относились к грамположительным бактериям (86,8%), грибам (2,6%) и ИК характеризовалась мономикробностью (92,1%).

В 4-й старческой группе (76–90 лет) больные ИК составляли 28,6%, все находились в условиях стационара (100,0%), лихорадочное состояние

сопровождало в 50,0% случаев.

ИК отмечали на фоне заболевания системы кровообращения и при ИЭ в 25,0% случаев. ИК была грамотрицательной и грамположительной в равных долях (50,0%) с мономикробностью в 100,0%.

### **Резюме**

В молодой группе (10–44 лет) больные ИК составляли 43,2%, включая госпитальных (58,7% больных). ИК осложняла заболевания системы кровообращения, вызывала лихорадку и характеризовалась грамположительной, реже – грибковой, чаще – моноинфекцией. В средней группе (45–60 лет) больные ИК составляли 38,5%, включая госпитальных (73,0% случаев). ИК осложняла заболевания системы кровообращения, сопровождала лихорадку. ИК чаще имела возбудителей из грамположительных бактерий и была мономикробного характера. В пожилой группе (61–75 лет) больные ИК составляли 38,8%, включая госпитальных (73,7% случаев). ИК осложняла заболевания системы кровообращения, сопутствовала лихорадке. Возбудители ИК относились к грамположительным бактериям, грибам и характеризовалась мономикробностью. В старческой группе (76–90 лет) больные ИК составляли 28,6%, все находились в условиях стационара.

При ИК температура тела повышалась в 44,4% случаях. Озноб регистрировали у больных в 48,9% случаев. У 1230 терапевтических больных ГИК чаще регистрировалась у мужчин, а ВГИК – у женщин.

## ГЛАВА 4. ВЕРИФИКАЦИЯ ИНФЕКЦИИ КРОВОТОКА У ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Диагностика ИК у терапевтических больных представляет собой сложную задачу, которую реально возможно решить, используя принципы культуромики в микробиологической практике [149]. Выделение микроорганизмов из крови считается сложной диагностической техникой и получение гемокультуры является показателем качества в клинической микробиологии. Согласно опубликованным данным этиология современной ИК характеризуется полимикробным составом циркулирующих микроорганизмов в кровотоке, включая бактерии и грибы, что осложняет диагностику и подбор соответствующей антимикробной терапии [187, 254, 352].

Применяя принципы культуромики, мы получили следующие результаты микробиологического исследования крови у терапевтических больных.

### 4.1. Особенности инфекции кровотока у терапевтических пациентов

ИК изучали по результатам исследования крови 1230 терапевтических госпитальных (848) и внегоспитальных (382) больных и диагностировали у 508 (41,3%) больных. Из 2075 посевов крови гемокультуру получили у 642 (30,9%) при взятии 1,7 пробы крови на одного больного. Этиологию ИК терапевтических больных изучали на 642 полученных гемокультурах и 816 выделенных штаммах микроорганизмов (Таблица 34).

Таблица 34 – Характеристики выделенных штаммов микроорганизмов при ИК у терапевтических больных

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/ палочки	Грам (-) палочки	Дрожжи	Плесени
Количество	480	228	20	75	7	6
%	59,8	28,4	2,5	9,3	53,8	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



Из таблицы 34 видно, что микробный пейзаж выделенных возбудителей ИК характеризовался бактериями (98,4%) и грибами (1,6%). Выявление аэробных бактерий наблюдали чаще, чем анаэробных (83,6% и 14,8% соответственно;  $p < 0,001$ ). Из общего количества бактерий (803) грамположительные кокки чаще определялись, чем грамположительные палочки (59,8% и 28,4% соответственно;  $p < 0,001$ ), среди грамотрицательных микроорганизмов – палочки преобладали над короткими палочками (9,3% и 2,5% соответственно;  $p < 0,001$ ). Значимой разницы между дрожжевыми и плесневыми грибами не замечено (53,8% и 46,2% соответственно;  $p=0,70$ ). Нами изучен этиологический пейзаж ИК у терапевтических больных (Таблица 35).

Таблица 35 – Видовой состав возбудителей ИК у терапевтических больных

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n= 816)		Индекс встречаемости ИВ, % (n = 642)
	абс.	%	
<b>Аэробные микроорганизмы</b>	682	83,6	106,2
<b>Грамположительные кокки</b>	472	57,8	73,5
<i>S.aureus</i>	34	4,2	5,3
<i>S.epidermidis</i>	244	29,9	38,0
<i>S.haemolyticus</i>	40	4,9	6,2
<i>S.hominis</i>	4	0,5	0,6
<i>S.lugdunensis</i>	1	0,1	0,2
<i>S.saprophyticus</i>	20	2,4	3,1
<i>S.sciuri</i>	7	0,9	1,1
<i>S.warneri</i>	3	0,4	0,5
<i>S.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.mucilaginoso</i>	1	0,1	0,2
<i>S.pyogenes</i>	2	0,2	0,3
<i>S.mitis</i>	68	8,3	10,6
<i>S.mutans</i>	9	1,1	1,4
<i>S.salivarius</i>	3	0,4	0,5
<i>S.sanguinis</i>	2	0,2	0,3
<i>S.agalactiae</i>	1	0,1	0,2
<i>Leuconostoc spp.</i>	1	0,1	0,2
<i>E.faecalis</i>	14	1,7	2,2
<i>E.faecium</i>	3	0,4	0,5
<i>E.raffinosis</i>	1	0,1	0,2
<b>Грамположительные неспоровые палочки</b>	99	12,1	15,4

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n= 816)		Индекс встречаемости ИВ, % (n = 642)
	абс.	%	
<i>C.ulcerans</i>	22	2,7	3,4
<i>C.bovis</i>	6	0,7	0,9
<i>C.minutissimum</i>	12	1,5	1,9
<i>C.pseudotuberculosis</i>	8	1,0	1,2
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	2	0,2	0,3
<i>C.xerosis</i>	6	0,7	0,9
<i>C.jejkeium</i>	6	0,7	0,9
<i>C.kutscheri</i>	3	0,4	0,5
<i>Corynebacterium spp.</i>	8	1,0	1,2
<i>p.Kurthia</i>	10	1,2	1,6
<i>Tsukamurella paurometabola</i> *****	1	0,1	0,2
грам(+) аэробная	2	0,2	0,3
<i>Listeria spp.</i>	1	0,1	0,2
<i>Nocardia spp.</i>	4	0,5	0,6
<i>A.viscosus</i>	1	0,1	0,2
<i>Actinomyces spp.</i>	5	0,6	0,8
<i>B.bostelensis</i>	1	0,1	0,2
<i>L.salivarius</i>	1	0,1	0,2
<b>Грамположительные споровые палочки</b>	22	2,7	3,4
<i>B.cereus</i>	10	1,2	1,6
<i>B.subtilis</i>	7	0,9	1,1
<i>B.polymyxa</i>	1	0,1	0,2
<i>B.megaterium</i>	2	0,2	0,3
<i>Bacillus spp.</i>	2	0,2	0,3
<b>Грамотрицательные кокки и коккобактерии</b>	17	2,1	2,6
<i>N.flava</i>	1	0,1	0,2
<i>N.flavescens</i>	1	0,1	0,2
<i>Branhamella catarrhalis</i> ****	5	0,6	0,8
<i>A.lwoffii</i>	10	1,2	1,6
<b>Грамотрицательные палочки</b>	72	8,8	11,2
<i>S.enteritidis</i>	1	0,1	0,2
<i>E.coli</i>	19	2,3	3,0
<i>Klebsiella aerogenes</i> **	5	0,6	0,8
<i>K.pneumoniae</i>	2	0,2	0,3
<i>S.marcescens</i>	2	0,2	0,3
<i>S.liquefaciens</i>	5	0,6	0,8
<i>S.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

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n= 816)		Индекс встречаемости ИВ, % (n = 642)
	абс.	%	
<i>P.vulgaris</i>	2	0,2	0,3
<i>H.haemolyticus</i>	4	0,5	0,6
<b>Анаэробные</b>	121	14,8	18,8
<b>Грамположительные кокки</b>	8	1,0	1,2
<i>Peptococcus spp.</i>	8	1,0	1,2
<b>Грамположительные палочки</b>	103	12,6	16,0
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2	0,2	0,3
<i>A.israelii</i>	1	0,1	0,2
<i>Cutibacterium acnes</i> *****	100	19,3	15,6
<b>Грамположительные споровые палочки</b>	4	0,5	0,6
<i>C.formicaceticum</i>	3	0,4	0,5
<i>Clostridium spp.</i>	1	0,1	0,2
<b>Грамотрицательные палочки</b>	3	0,4	0,5
<i>Fusobacterium spp.</i>	1	0,1	0,2
<i>B.fragilis</i>	2	0,2	0,3
<b>Грамотрицательные кокки</b>	3	0,4	0,5
<i>V.parvula</i>	3	0,4	0,5
<b>Грибы</b>	13	1,6	2,0
<i>C.albicans</i>	5	0,6	0,8
<i>Rhodotorula spp.</i>	2	0,2	0,3
<i>A.niger</i>	6	0,7	0,9

Примечание:

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

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

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

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

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

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

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

Из представленной таблицы 35 видно, что спектр выделенных микроорганизмов состоит из 32 родов аэробных, 8 родов анаэробных бактерий и 3 родов грибов. Из 816 штаммов микроорганизмов у 778 установили виды (95,2%) и 39 штаммов – недифференцированные (4,8%). Среди аэробных бактерий лидируют грамположительные кокки (57,8%) и грамположительные неспорообразующие палочки (12,1%). Среди грамположительных кокков доминируют *S.epidermidis* (29,9%) и *S.mitis* (8,3%). Среди коринеформных грамположительных палочек преобладает вид *C.ulcerans* (2,7%), а в группе грамотрицательных палочек – *E.coli* (2,4%). Среди анаэробов лидируют грамположительные неспорообразующие палочки (12,6%). Для качественной оценки роли отдельных видов в этиологии ИК рассчитывали индексы встречаемости (ИВ) микроорганизма в положительной

гемокультуре. Согласно определению экологического словаря ИВ – это индекс встречаемости агента в пробе, выраженный в процентах к общему числу проб. Индекс относится к цифровому показателю и применяется в медицинских исследованиях [66, 91]. В нашем изучении индекс аэробов превосходил в 5,6 раза данный показатель у анаэробов (106,2% и 18,8% соответственно). Среди аэробных микроорганизмов по частоте встречаемости доминируют грамположительные кокки (73,5%) и значительно реже встречаются грамотрицательные палочки (11,2%). В группе грамположительных кокков по результатам ИВ лидируют: *S.epidermidis* (38,0%), *S.mitis* (10,6%). Низкий ИВ среди грамположительных кокков: *S.haemolyticus* (6,2%), *S.aureus* (5,3%), у грамотрицательных палочек – *E.coli* (3,0%), у грамположительных палочек – *C.ulcerans* (3,4%). Высокий ИВ среди анаэробных микроорганизмов отмечается у грамположительных палочек (16,0%). При изучении полимикробности гемокультур оказалось, что частота мономикробных гемокультур доминировала над полимикробными (78,2% и 21,8% соответственно;  $p < 0,001$ ). Выявление полиинфекции в 21,8% случаев подтвердило хронический характер инфекции в крови у больных при терапевтических заболеваниях. Характеристики ассоциантов в полимикробных гемокультурах представлены в таблице 36.

Таблица 36 – Характеристики ассоциантов в полимикробных гемокультурах

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

Из таблицы 36 видно, что полимикробные гемокультуры состояли из двух (80,7%), реже – из трех (16,4%) и из четырех (2,9%) ассоциантов. Полимикробность гемокультур свойственна хроническому течению инфекционного процесса, поэтому ассоциации характеризуются разными количественными и качественными сочетаниями микроорганизмов. Наиболее частый вариант симбиоза состоял из двух разных видов бактерий (63,6%), в 2,1 раза реже встречались сочетания аэробных бактерий с анаэробными (30,7%). Бактерии с грибами или комбинация из

анаэробных бактерий были замечены редко (4,3% и 1,4% соответственно). Далее мы изучили виды микроорганизмов–участников в полимикробных гемокультурах (Таблица 37).

Таблица 37 – Варианты симбиоза из двух ассоциантов с видовой характеристикой микроорганизмов

Виды микроорганизмов в ассоциации (n=113)	абс.	%
<i>S.epidermidis</i> и <i>C.acnes</i>	16	14,2
<i>S.epidermidis</i> и <i>S.mitis</i>	4	3,5
<i>S.epidermidis</i> и <i>Corynebacterium spp.</i>	14	12,4
<i>S.epidermidis</i> и <i>p.Kurthia spp.</i>	3	2,7
<i>S.epidermidis</i> и <i>S.aureus</i>	4	3,5
<i>S.epidermidis</i> и <i>E.faecalis</i>	4	3,5
<i>S.epidermidis</i> и грамотрицательные палочки	4	3,5

Из таблицы 37 видно, что к наиболее частым комбинациям в полимикробных гемокультурах среди грамположительных бактерий мы отнесли сочетания кокков с палочками: *S.epidermidis* с *C.acnes* и *S.epidermidis* с *Corynebacterium spp.* (14,2% и 12,4% соответственно). Эти микроорганизмы иногда рассматриваются кожными контаминантами. Современные исследователи относят вышеперечисленные микроорганизмы к возбудителям гнойно-воспалительных заболеваний, включая ИК [61, 220, 286, 299, 371]. В единичных случаях были выделены комбинации: *S.aureus* и *E.coli*, *S.epidermidis* и *Candida spp.*, *S.mitis* и *Candida spp.*, *C.acnes* и *A.niger*. Всего 311 штаммов (38,1%) из общего числа выделенных микроорганизмов являлись ассоциантами полимикробных гемокультур и состояли из аэробов (82,0%), анаэробов (16,1%) и грибов (1,9%). По данным ИВ также преобладали аэробные над анаэробными бактериями и грибами (182,1%, 35,7% и 4,3% соответственно). Среди грамположительных аэробных ассоциантов доминировали кокки над палочками (75,2% и 25,8% соответственно;  $p < 0,001$ ), среди грамотрицательных аэробных ассоциантов – палочки над кокками (73,9% и 26,1% соответственно;  $p < 0,001$ ). Показатели ИВ у грамположительных кокков равнялись 110,7% и у грамотрицательных палочек – 24,3%. Среднее арифметическое значение ИВ среди морфологических форм–ассоциантов показало частоту грамположительных кокков (7,0%) в полимикробной гемокультуре. Грамотрицательные короткие палочки и

грамположительные палочки в равных долях участвовали в полимикробности (2,9% и 2,1% соответственно). Плесневые грибы чаще, чем дрожжевые, находились в симбиозе с бактериями (2,1% и 1,0% соответственно).

Нами был проанализирован видовой состав и частота встречаемости ассоциантов в полимикробных гемокультурах (Таблица 38).

Таблица 38 – Видовой состав ассоциантов и частота их встречаемости в полимикробных гемокультурах

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n= 311)		Индекс встречаемости ИВ, % (n=140)
	абс.	%	
<b>Аэробные микроорганизмы</b>	255	82,0	182,1
<b>Грамположительные кокки</b>	155	49,8	110,7
<i>S.aureus</i>	12	3,9	8,6
<i>S.epidermidis</i>	74	23,8	52,9
<i>S.haemolyticus</i>	11	3,5	7,9
<i>S.hominis</i>	2	0,6	1,4
<i>S.saprophyticus</i>	12	3,9	8,6
<i>S.sciuri</i>	4	1,3	2,9
<i>S.auricularis</i>	1	0,3	0,7
<i>S.hyicus</i>	2	0,6	1,4
<i>M.luteus</i>	1	0,3	0,7
<i>S.pyogenes</i>	1	0,3	0,7
<i>S.mitis</i>	21	6,8	15,0
<i>S.mutans</i>	5	1,6	3,6
<i>S.salivarius</i>	2	0,6	1,4
<i>E.faecalis</i>	5	1,6	3,6
<i>E.faecium</i>	2	0,6	1,4
<b>Грамположительные палочки</b>	50	16,1	35,7
<i>C.ulcerans</i>	10	3,2	7,1
<i>C.bovis</i>	6	1,9	4,3
<i>C.minutissimum</i>	8	2,6	5,7
<i>C.pseudotuberculosis</i>	3	1,0	2,1
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	2	0,6	1,4
<i>C.xerosis</i>	2	0,6	1,4
<i>C.jejkeium</i>	3	1,0	2,1
<i>C.kutscheri</i>	1	0,3	0,7
<i>Corynebacterium spp.</i>	6	1,9	4,3
<i>p.Kurthia</i>	4	1,3	2,9
<i>T.paurometabola*****</i>	1	0,3	0,7
грам(+) аэробная	2	0,6	1,4
<i>Nocardia spp.</i>	1	0,3	0,7
<i>Actinomyces spp.</i>	1	0,3	0,7
<b>Грамположительные споровые палочки</b>	4	1,3	2,9
<i>B.cereus</i>	2	0,6	1,4
<i>B.subtilis</i>	1	0,3	0,7
<i>Bacillus spp.</i>	1	0,3	0,7
<b>Грамотрицательные кокки и коккобактерии</b>	12	3,9	8,6

Продолжение таблицы 38

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n= 311)		Индекс встречаемости ИВ, % (n=140)
	абс.	%	
<i>N.flavescens</i>	1	0,3	0,7
<i>Branhamella catarrhalis</i> ***	5	1,6	3,6
<i>A.lwoffii</i>	6	1,9	4,3
<b>Грамотрицательные палочки</b>	34	10,9	24,3
<i>E.coli</i>	5	1,6	3,6
<i>S.marcescens</i>	1	0,3	0,7
<i>S.liquefaciens</i>	4	1,3	2,9
<i>S.marinorubra</i> *	2	0,6	1,4
<i>E.cloacae</i>	2	0,6	1,4
<i>Pantoea agglomerans</i> **	3	1,0	2,1
<i>P.stuartii</i>	3	1,0	2,1
<i>P.aeruginosa</i>	5	1,6	3,6
<i>P.putida</i>	1	0,3	0,7
<i>P.maltophilia</i>	1	0,3	0,7
<i>Burkholderia cepacia</i> ****	4	1,3	2,9
<i>A.faecalis</i>	1	0,3	0,7
<i>H.haemolyticus</i>	2	0,6	1,4
<b>Анаэробные микроорганизмы</b>	50	16,1	35,7
<b>Грамположительные кокки</b>	5	1,6	3,6
<i>Peptococcus spp.</i>	5	1,6	3,6
<b>Грамположительные палочки</b>	42	13,5	30,0
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2	0,6	1,4
<i>Cutibacterium acnes</i> *****	40	12,9	28,6
<b>Грамотрицательные палочки</b>	2	0,6	1,4
<i>Fusobacterium spp.</i>	1	0,3	0,7
<i>B.fragilis</i>	1	0,3	0,7
<b>Грамотрицательные кокки</b>	1	0,3	0,7
<i>V.parvula</i>	1	0,3	0,7
<b>Грибы</b>	6	1,9	4,3
<i>C.albicans</i>	2	0,6	1,4
<i>Rhodotorula spp.</i>	1	0,3	0,7
<i>A.niger</i>	3	1,0	2,1

Примечание:

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

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

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

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

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

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

Из таблицы 38 видно, что в составе полимикробных гемокультур преобладали *S.epidermidis* (23,8%) и *C.acnes* (12,9%), также и по показателю ИВ (52,9% и 28,6% соответственно). В грамположительной кокковой группе часто выявляли: *S.aureus* (3,9%), *S.saprophyticus* (3,9%), *S.haemolyticus* (3,5%), *S.mitis*

(6,8%), *E.faecalis* (1,6%). Среди грамположительных палочек частыми ассоциантами были *C.ulcerans* (3,2%), *C.bovis* (1,9%), *C.minutissimum* (2,6%). Немного реже из группы грамотрицательных коротких палочек и палочек участвовали *E.coli* (1,6%), *P.aeruginosa* (1,6%), *B.catarrhalis* (1,6%), *A.lwoffii* (1,9%). Среди анаэробных микроорганизмов лидировала *C.acnes* (12,9%) и из грибов – *A.niger* (1,0%). ИВ подтвердили частоту присутствия в сообществе представленных микроорганизмов, которые являются потенциальными ассоциантами полимикробных гемокультур.

Таким образом, ИК является инфекционным осложнением терапевтических заболеваний у 41,3% больных. Верифицировали ИК получением гемокультур в 30,9% случаев при использовании 1,7 проб крови на одного больного. Из общего числа выделенных микроорганизмов (816) бактерии составляли 98,4% и грибы – 1,6% случаев. К бактериям принадлежали аэробные (83,6%) и анаэробные (14,8%) представители. Группу аэробов возглавляли грамположительные кокки (57,8%) с ведущими видами *S.epidermidis* и *S.mitis*. Среди анаэробов лидировала *C.acnes*. ИВ этих микроорганизмов подтвердил полученные результаты. ИК терапевтических больных характеризовалась полимикробностью до 21,8% случаев с участием от 2-х до 4-х ассоциантов. Симбиоз полимикробных гемокультур состоял из разных видов микроорганизмов.

#### **4.1.1. Этиологический спектр инфекции кровотока госпитального (внутрибольничного) происхождения**

В середине 70-х годов XX века ведущими возбудителями ГИК считались грамотрицательные палочки и золотистый стафилококк. В настоящее время в этиологии ИК придают диагностическое значение КНС и энтерококкам, которых ранее относили к контаминантам гемокультур, поэтому однократное выделение этих микроорганизмов из крови в настоящее время имеет клиническое значение. Список ведущих возбудителей ИК пополнился грибами рода *Candida*. По данным Европейской Рабочей Группы в ГИК ведущими возбудителями являются: *S.epidermidis*, другие КНС, *S.aureus* и характерна полимикробность (22%) [132]. В России в ГИК также ведущими возбудителями являются *S.epidermidis* (11,0% –



39,1%), *S.aureus* (23,5% – 27,5%) [84, 106]. В настоящее время частота анаэробной госпитальной Б составляет 4% с ведущим возбудителем *B.fragilis* (55,0%), но с уровнем летальности в 19,0% и высоким уровнем полимикробности (48,4%).

ГИК изучали на основе микробиологического исследования крови 848 госпитальных пациентов кардиологического профиля и диагностировали ИК у 325 (38,3%) больных. При выполнении 1594 исследований крови получили гемокультуру у 436 (27,4%). Этиологическую характеристику госпитальной ИК изучали на 519 штаммах выделенных микроорганизмов. Особенности больных с гемокультурами представлены в таблице 39.

Таблица 39 – Гендерная и возрастная характеристики госпитальных больных с ИК

Показатель	Госпитальные больные (n=325)					
	Гендерные характеристики		Возрастные характеристики			
	мужчины	женщины	1 группа (10-44 лет)	2 группа (45-60 лет)	3 группа (61-75 лет)	4 группа (76-90 лет)
Количество	166	159	190	103	28	4
%	52,1	48,9	58,5	31,7	8,6	1,2
95% ДИ	45,7-56,5	43,5-54,3	53,0-63,7	26,9-36,9	6,0-12,2	0,5-3,1

Из таблицы 39 видно, что среди госпитальных больных с подтвержденной ИК число мужчин и женщин статистически не отличалось (52,1% и 48,9% соответственно;  $p=0,41$ ). Больные молодого (10–44 лет) и среднего (45–60 лет) возраста чаще имели ИК, чем лица пожилого (61–75 лет) и старческого возраста (76–90 лет) (90,2% и 9,8% соответственно;  $p < 0,001$ ). Характеристики выделенных микроорганизмов представлены в таблице 40.

Из таблицы 40 видно, что выделенные штаммы микроорганизмов чаще относились к аэробам (89,4%), чем к анаэробам (9,4%) и грибам (1,2%) и ИВ данных микробов в гемокультурах подтвердил частоту (106,4%, 11,2% и 1,4% соответственно). Грамположительную ИК отмечали чаще, чем грамотрицательную (88,1% и 11,9% соответственно;  $p < 0,001$ ). Грамположительные кокки выделяли из крови чаще, чем грамположительные палочки (64,5% и 23,6% соответственно;  $p < 0,001$ ). Различий по получению гемокультур из дрожжеподобных и плесневых грибов не выявлено. В этиологии ГИК доминировали аэробные грамположительные кокки (70,7%) и анаэробные

грамположительные неспоровые палочки (75,5%). Видовой пейзаж ГИК представлен в таблице 41.

Таблица 40 – Характеристики выделенных микроорганизмов из крови у госпитальных больных

Показатель	Характеристика штаммов микроорганизмов (n=519)					
	аэробные	анаэробные	грибы			
Количество	464	49	6			
%	89,4	9,4	1,2			
95% ДИ	86,5-91,8	7,2-12,3	0,5-2,5			
Индекс встречаемости С, % (n=436)	106,4	11,2	1,4			
Показатель	Бактерии (n = 513)				Грибы (n=6)	
	Грам (+) кокки	Грам (+) палочки	Грам (-) короткие палочки	Грам (-) палочки	Дрож-жи	Плес-невые
Количество	331	121	14	47	3	3
%	64,5	23,6	2,7	9,2	3/6	3/6
95% ДИ	60,3-68,5	20,1-27,4	1,6-4,5	7,0-12,0		

Таблица 41 – Видовой спектр возбудителей ИК у госпитальных больных

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n= 519)		Индекс встречаемости ИВ, % (n=436)
	абс.	%	
<b>Аэробные микроорганизмы</b>	464	89,4	106,4
<b>Грамположительные кокки</b>	328	63,2	75,2
<i>S.aureus</i>	21	4,0	4,8
<i>S.epidermidis</i>	167	32,2	38,3
<i>S.haemolyticus</i>	34	6,6	7,8
<i>S.saprophyticus</i>	15	2,9	3,4
<i>S.sciuri</i>	6	1,2	1,4
<i>S.warneri</i>	2	0,4	0,5
<i>S.xylosus</i>	2	0,4	0,5
<i>S.cohnii</i>	2	0,4	0,5
<i>S.hyicus</i>	4	0,8	0,9
<i>S.pyogenes</i>	1	0,2	0,2
<i>S.mitis</i>	54	10,4	12,4
<i>S.mutans</i>	7	1,3	1,6
<i>S.sanguinis</i>	2	0,4	0,5
<i>S.agalactiae</i>	1	0,2	0,2
<i>E.faecalis</i>	10	1,9	2,3
<b>Грамположительные палочки</b>	60	11,6	13,8
<i>C.ulcerans</i>	14	2,7	3,2
<i>C.bovis</i>	2	0,4	0,5
<i>C.minutissimum</i>	9	1,7	2,1
<i>C.pseudotuberculosis</i>	6	1,2	1,4
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	1	0,2	0,2
<i>C.xerosis</i>	5	1,0	1,1

Продолжение таблицы 41

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n= 519)		Индекс встречаемости ИВ, % (n=436)
	абс.	%	
<i>C.jejkeium</i>	5	1,0	1,1
<i>C.jejkeium</i>	5	1,0	1,1
<i>C.kutscheri</i>	3	0,6	0,7
<i>p.Kurthia</i>	9	1,7	2,1
грам(+) аэробная	1	0,2	0,2
<i>Nocardia spp.</i>	2	0,4	0,5
<i>A.viscosus</i>	1	0,2	0,2
<i>Actinomyces spp.</i>	1	0,2	0,2
<i>L.salivarius</i>	1	0,2	0,2
<b>Грамположительные споровые палочки</b>	20	3,9	4,6
<i>B.cereus</i>	9	1,7	2,1
<i>B.subtilis</i>	6	1,2	1,4
<i>B.polymyxa</i>	1	0,2	0,2
<i>B.megaterium</i>	2	0,4	0,5
<i>Bacillus spp.</i>	2	0,4	0,5
<b>Грамотрицательные кокки и коккобактерии</b>	11	2,1	2,5
<i>N.flavescens</i>	1	0,2	0,2
<i>Branhamella catarrhalis***</i>	4	0,8	0,9
<i>A.lwoffii</i>	6	1,2	1,4
<b>Грамотрицательные палочки</b>	45	8,7	10,3
<i>S.enteritidis</i>	1	0,2	0,2
<i>E.coli</i>	18	3,5	4,1
<i>K.aerogenes*</i>	1	0,2	0,2
<i>K.pneumoniae</i>	2	0,4	0,5
<i>S.liquefaciens</i>	1	0,2	0,2
<i>E.cloacae</i>	2	0,4	0,5
<i>Pantoea agglomerans**</i>	5	1,0	1,1
<i>C.freundii</i>	1	0,2	0,2
<i>Citrobacter spp.</i>	1	0,2	0,2
<i>P.stuartii</i>	3	0,6	0,7
<i>P.aeruginosa</i>	1	0,2	0,2
<i>P.maltophilia</i>	1	0,2	0,2
<i>A.faecalis</i>	2	0,4	0,5
<i>P.vulgaris</i>	2	0,4	0,5
<i>H.haemolyticus</i>	4	0,8	0,9
<b>Анаэробные микроорганизмы</b>	49	9,4	11,2
<b>Грамположительные кокки</b>	3	0,6	0,7
<i>Peptococcus spp.</i>	3	0,6	0,7
<b>Грамположительные палочки</b>	37	7,1	8,5
<i>A.israelii</i>	1	0,2	0,2
<i>Cutibacterium acnes****</i>	36	6,9	8,3
<b>Грамположительные споровые палочки</b>	4	0,8	0,9
<i>C.formicaceticum</i>	3	0,6	0,7
<i>Clostridium spp.</i>	1	0,2	0,2
<b>Грамотрицательные палочки</b>	2	0,4	0,5
<i>B.fragilis</i>	2	0,4	0,5

Продолжение таблицы 41

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n= 519)		Индекс встречаемости ИВ, % (n=436)
	абс.	%	
<b>Грамотрицательные кокки</b>	3	0,6	0,7
<i>V.parvula</i>	3	0,6	0,7
<b>Грибы</b>	6	1,2	1,4
<i>C.albicans</i>	3	0,6	0,7
<i>A.niger</i>	3	0,6	0,7

Примечание:

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

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

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

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

Из таблицы 41 видно, что 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 коротких палочек (2,1%). В структуру грамположительных кокков входили виды: *S.epidermidis* (32,2%), *S.haemolyticus* (6,6%), *S.aureus* (4,0%), *S.mitis* (10,4%). Остальные виды встречались в единичном количестве. Отмечали повышенный рост аэробных грамположительных: *C.ulcerans* (2,7%), *B.cereus* (1,7%); грамотрицательных: *E.coli* (3,5%), *A.lwoffii* (1,2%); анаэробных грамположительных *C.acnes* (6,9%) бактерий. Разницу в выявлении дрожжевых и плесневых грибов не наблюдали (0,6%). ИВ аэробных значительно превышал ИВ анаэробных бактерий (106,4% и 11,2%, соответственно). ИВ подтвердил частоту грамположительной кокковой ИК по отношению к грамотрицательной палочковой (75,2% и 10,3%, соответственно) этиологии ИК. Среди грамположительных кокков ИВ в гемокультуре: *S.epidermidis* (38,3%), *S.haemolyticus* (7,8%), *S.mitis* (12,4%). ИВ *E.coli* оказался ниже ИВ *S.epidermidis* (4,1% и 38,3%, соответственно), что подтверждает ведущую роль эпидермального стафилококка в этиологии ИК. В наших исследованиях *C.acnes* имела наивысший ИВ среди анаэробов (8,3%), в настоящее время этому анаэробному микроорганизму отводится роль возбудителя при артритах, эндокардите, ИК.

ГИК протекала чаще в виде мономикробной, чем полимикробной инфекции

(83,7% и 16,3% соответственно;  $p < 0,001$ ).

Нами были проанализированы особенности полимикробных гемокультур (Таблица 42).

Таблица 42 – 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	

Мы показали, что полимикробные гемокультуры характеризовались двумя и тремя ассоциантами в одной пробе крови (85,9% и 14,1% соответственно;  $p < 0,001$ ) (Таблица 42). Полимикробность демонстрирует различные комбинации микроорганизмов: сочетание разных представителей аэробов (81,7%), аэробов с анаэробами (16,9%), бактерий с грибами (1,4%). Участники полимикробных гемокультур представлены аэробными бактериями (91,4%), реже – анаэробными (7,8%) и грибами (0,7%). ИВ также выделил аэробные бактерии, как наиболее частые ассоцианты гемокультур (195,8%). Осложнения госпитальной ИК при терапевтической патологии представлены в таблице 43. Из таблицы 43 видно наличие ГИК более, чем у трети терапевтических больных: при ревматизме (42,4%), миокардите (40,7%), ИЭ (38,9%), ВПС (34,5%), ИБС (32,4%), ЛНП (36,0%). В графу «Прочие диагнозы» отнесены стационарные больные с заболеваниями: органов дыхания, костно-мышечной системы, органов пищеварения, мочеполовой системы. Наибольшее число штаммов микроорганизмов получено при посеве крови больных ИЭ и с ЛНП (50,8% и 41,8% соответственно). При терапевтических заболеваниях ГИК у больных чаще имела мономикробный характер, чем полимикробный. Выявлена наибольшая частота полимикробности ИК у больных при ИБС (11,8%) и ЛНП (11,4%) по отношению к сниженным показателям при миокардите (8,8%), ревматизме (7,6%), ИЭ (7,2%) и

ВПС (5,5%).

Таблица 43 – ИК у госпитальных больных при терапевтических заболеваниях

Показатели	Клинические диагнозы кардиологических больных					Лихорадка	Прочие диагнозы
	Инфекционный эндокардит	Ревматизм	Врожденные пороки сердца	Миокардит	Ишемическая болезнь сердца		
Всего больных	306	132	55	91	68	175	21
Всего больных с ИК	119	56	19	37	22	63	9
%	38,9	42,4	34,5	40,7	32,4	36,0	42,9
95% ДИ	33,6-44,5	34,3-51,0	23,4-47,7	31,1-50,9	22,4-44,2	29,3-43,3	24,5-63,5
Доля больных с ИК (n=325)	119	56	19	37	22	63	9
%	36,6	17,2	5,8	11,4	6,8	19,4	2,8
95% ДИ	31,6-42,0	13,5-21,7	3,8-8,9	8,4-15,3	4,5-10,0	15,5-24,0	1,5-5,2
Доля штаммов (n=325)	165	72	38	62	35	136	11
%	50,8	22,2	11,7	19,1	10,8	41,8	3,4

Видовой состав ассоциантов полимикробных гемокультур ГИК представлен в таблице 44.

Таблица 44 – Видовой состав ассоциантов полимикробных гемокультур при ГИК

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n= 152)		Индекс встречаемости ИВ, % (n=71)
	абс.	%	
<b>Аэробные микроорганизмы</b>	139	91,4	195,8
<b>Грамположительные кокки</b>	86	56,6	121,1
<i>S.aureus</i>	5	3,3	7,0
<i>S.epidermidis</i>	38	25,0	53,5
<i>S.haemolyticus</i>	8	5,3	11,3
<i>S.saprophyticus</i>	9	5,9	12,7
<i>S.sciuri</i>	4	2,6	5,6
<i>S.hyicus</i>	3	2,0	4,2
<i>S.pyogenes</i>	1	0,7	1,4
<i>S.mitis</i>	13	8,6	18,3
<i>S.mutans</i>	4	2,6	5,6
<i>E.faecalis</i>	2	1,3	2,8
<b>Грамположительные палочки</b>	30	19,7	42,3
<i>C.ulcerans</i>	9	5,9	12,7
<i>C.bovis</i>	2	1,3	2,8
<i>C.minutissimum</i>	6	3,9	8,5

Продолжение таблицы 44

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n= 152)		Индекс встречаемости ИВ, % (n=71)
	абс.	%	
<i>C.pseudotuberculosis</i>	2	1,3	2,8
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	1	0,7	1,4
<i>C.xerosis</i>	1	0,7	1,4
<i>C.jeiikeium</i>	3	2,0	4,2
<i>C.kutscheri</i>	1	0,7	1,4
<i>p.Kurthia</i>	4	2,6	5,6
грам(+) аэробная	1	0,7	1,4
<b>Грамположительные споровые палочки</b>	2	1,3	2,9
<i>B.cereus</i>	1	0,7	1,4
<i>Bacillus spp.</i>	1	0,7	1,4
<b>Грамотрицательные кокки и коккобактерии</b>	7	4,6	9,9
<i>Branhamella catarrhalis</i> *	4	2,6	5,6
<i>A.lwoffii</i>	3	2,0	4,2
<b>Грамотрицательные палочки</b>	14	9,2	19,7
<i>E.coli</i>	4	2,6	5,6
<i>Pantoea agglomerans</i> **	3	2,0	4,2
<i>P.stuartii</i>	3	2,0	4,2
<i>P.aeruginosa</i>	1	0,7	1,4
<i>P.maltophilia</i>	1	0,7	1,4
<i>H.haemolyticus</i>	2	1,3	2,8
<b>Анаэробные микроорганизмы</b>	12	7,9	16,9
<b>Грамположительные кокки</b>	1	0,7	1,4
<i>Peptococcus spp.</i>	1	0,7	1,4
<b>Грамположительные палочки</b>	9	5,9	12,7
<i>Cutibacterium acnes</i> ***	9	5,9	12,7
<b>Грамотрицательные палочки</b>	1	0,7	1,4
<i>V.fragilis</i>	1	0,7	1,4
<b>Грамотрицательные кокки</b>	1	0,7	1,4
<i>V.parvula</i>	1	0,7	1,4
<b>Грибы</b>	1	0,7	1,4
<i>C.albicans</i>	1	0,7	1,4

Примечание:

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

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

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

Из таблицы 44 видно, что к ведущим составляющим полимикробности из аэробных грамположительных бактерий относятся кокки (56,6%), редко – грамотрицательные палочки (9,2%). ИВ соответствуют этому показателю (121,1% и 19,7% соответственно). Активные участники полимикробности по данным ИВ: *S.epidermidis* (53,5%), *S.haemolyticus* (11,3%), *S.aureus* (7,0%), *S.saprophyticus* (5,9%), *S.mitis* (18,3%), *C.ulcerans* (12,7%).

Таким образом, ГИК диагностировалась у 38,3% терапевтических больных кардиологического профиля, в равных долях у мужчин и женщин молодого и среднего возраста. Из положительных гемокультур (27,4%) получили рост 519 штаммов микроорганизмов, включая аэробные (89,4%) и анаэробные (9,4%) бактерии и грибы (1,2%). Из числа аэробных микроорганизмов чаще получали рост грамположительных кокков (63,2%), среди которых лидировал *S.epidermidis* (32,2%), а среди анаэробов чаще высевали грамположительные неспоровые палочки (75,5%) с ведущим видом – *C.acnes* (6,9%). Этиология ГИК характеризовалась полимикробностью в 16,3% случаев с двумя или тремя ассоциантами в симбиозе. Частота осложнений ИК кардиологических заболеваний представлена в такой последовательности: ревматизм (42,4%), миокардит (40,7%), ИЭ (38,9%), ВПС (34,5%), ИБС (32,4%), ЛНП (36,0%). Полимикробная ИК чаще сопутствовала ИБС и ЛНП. Возбудителей из крови чаще выделяли при ИЭ и ЛНП.

#### **4.1.2. Этиологический спектр инфекции кровотока внегоспитального (внебольничного) происхождения**

Заболевания могут возникать и во внебольничной обстановке, за пределами учреждений здравоохранения и не быть связаны с предшествующим пребыванием в них. За счет ВГИК число случаев общей летальности при ИК увеличивается на 7,2% в год, выделяют широкий спектр возбудителей, клиническое значение эпидермального стафилококка, зеленыящего стрептококка и других условно-патогенных микроорганизмов относят на рассмотрение клиницистов [242]. При ВГИК отмечают высокие уровни лабораторных маркеров, наличие хронических коморбидных и полиморбидных состояний [197]. Возраст является основным фактором риска полиморбидности и связан с показателем смертности, инвалидности [15, 39, 97, 198]. Полиморбидные заболевания осложняют диагностику основного заболевания, наличие их является неблагоприятным прогностическим фактором и увеличивается с повышением возраста [97, 123]. Из всех внегоспитальных инфекций ВОЗ выделяет внебольничную пневмонию, представляющую проблему по числу случаев смерти и инвалидности, стертого характера клинических симптомов, что затрудняет диагностику и лечение [314].



В нашей работе ВГИК изучали на основе микробиологического исследования крови 382 внегоспитальных пациентов и диагностировали ИК у 183 пациентов (48,0%). При посеве 481 пробы крови получили гемокультуру в 206 (42,8%) пробах. Этиологию ВГИК изучали на 297 выделенных штаммах микроорганизмов. Мы оценили характеристики внегоспитальных больных с подтвержденной ВГИК (Таблица 45).

Таблица 45 – Характеристики внегоспитальных больных с ИК

Показатели	Внегоспитальные больные (n=183)				
	гендерные характеристики		возрастные характеристики		
	мужчины	женщины	1 группа (10–44 лет)	2 группа (45–60 лет)	3 группа (61–75 лет)
Абс.	63	120	137	36	10
%	34,4	65,6	74,9	19,7	5,5
95% ДИ	27,9-41,6	58,4-72,1	68,1-80,6	14,6-26,0	3,0-9,8

Из таблицы 45 видно, что ВГИК чаще осложняла основное заболевание у женщин, чем у мужчин (65,6% и 34,4% соответственно;  $p < 0,001$ ), включая возрастную категорию лиц молодого (10–44 лет) возраста (74,9%). Особенности выделенных микроорганизмов из гемокультур при ВГИК представлены в таблице 46.

Таблица 46 – Характеристики выделенных микроорганизмов из крови внегоспитальных больных

Показатели	Характеристика штаммов микроорганизмов (n = 297)								
	аэробные			анаэробные			грибы		
	абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ
Всего (n=297)	218	73,4	68,1-78,1	72	24,2	19,7-29,4	7	2,4	1,1-4,8
Индекс встречаемости С, % (n=206)	105,8			35,0			3,4		
Показатели	Бактерии (n=290)						Грибы (n=7)		
	Грам (+) кокки	Грам (+) палочки	Грам (-) короткие палочки	Грам (-) палочки	Дрожжи	Плесневые			
Количество	149	107	6	28	4	3			
%	51,4	36,9	2,1	9,6	4/7	3/7			
95% ДИ	45,6-57,1	31,5-42,6	1,0-4,4	6,8-13,6					

В таблице 46 описаны возбудители ВГИК, в состав которых входили аэробные (73,4%) и анаэробные бактерии (24,2%), грибы (2,4%). Бактерии чаще, чем грибы (97,7% и 2,3% соответственно;  $p < 0,001$ ), выделялись из крови.

Лидирующие позиции занимали грамположительные кокки (51,4%) и грамположительные палочки (36,9%), реже – грамтрицательные палочки (9,6%) и грамтрицательные короткие палочки (2,1%). Грибы *p.Candida* выделялись чаще, чем плесневые (57,1% и 42,9% соответственно). Видовой состав выделенных возбудителей ВГИК представлен в таблице 47.

Таблица 47 – Видовой состав возбудителей ИК у внегоспитальных больных

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n=297)		Индекс встречаемости ИВ, % (n=206)
	абс.	%	
<b>Аэробные микроорганизмы</b>	218	73,4	105,8
<b>Грамположительные кокки</b>	144	48,5	70,0
<i>S.aureus</i>	13	4,4	6,3
<i>S.epidermidis</i>	77	25,9	37,4
<i>S.haemolyticus</i>	6	2,0	2,9
<i>S.hominis</i>	4	1,3	1,9
<i>S.lugdunensis</i>	1	0,3	0,5
<i>S.saprophyticus</i>	5	1,7	2,4
<i>S.sciuri</i>	1	0,3	0,5
<i>S.warneri</i>	1	0,3	0,5
<i>S.xylosum</i>	1	0,3	0,5
<i>S.capitis</i>	1	0,3	0,5
<i>S.auricularis</i>	1	0,3	0,5
<i>M.luteus</i>	3	1,3	1,9
<i>Sarcina spp.</i>	1	0,3	0,5
<i>R.mucilaginosa</i>	1	0,3	0,5
<i>S.pyogenes</i>	1	0,3	0,5
<i>S.mitis</i>	14	4,7	6,8
<i>S.mutans</i>	2	0,7	1,0
<i>S.salivarius</i>	4	1,3	1,9
<i>Leuconostoc spp.</i>	1	0,3	0,5
<i>E.faecalis</i>	4	1,3	1,9
<i>E.faecium</i>	4	1,3	1,9
<i>E.raffinosa</i>	1	0,3	0,5
<b>Грамположительные палочки</b>	39	13,1	18,9
<i>C.ulcerans</i>	8	2,7	3,9
<i>C.bovis</i>	4	1,3	1,9
<i>C.minutissimum</i>	4	1,3	1,9
<i>C.pseudotuberculosis</i>	2	0,7	1,0
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	1	0,3	0,5
<i>C.xerosis</i>	1	0,3	0,5
<i>C.jejkeium</i>	1	0,4	0,5
<i>Corynebacterium spp.</i>	8	2,7	3,9
<i>p.Kurthia</i>	1	0,3	0,5
<i>Tsakamurella paurometabola*****</i>	1	0,3	0,5
грам(+) аэробная	1	0,3	0,5

Продолжение таблицы 47

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n=297)		Индекс встречаемости ИВ, % (n=206)
	абс.	%	
<i>Listeria spp.</i>	1	0,3	0,5
<i>Nocardia spp.</i>	2	0,7	1,0
<i>Actinomyces spp.</i>	4	1,3	1,9
<i>B.bostelensis</i>	1	0,3	0,5
<b>Грамположительные споровые палочки</b>	2	0,7	1,0
<i>B.cereus</i>	1	0,3	0,5
<i>B.subtilis</i>	1	0,3	0,5
<b>Грамотрицательные кокки и кокко- бактерии</b>	6	2,0	2,9
<i>N.flava</i>	1	0,3	0,5
<i>Branhamella catarrhalis</i> ***	1	0,3	0,5
<i>A.lwoffii</i>	4	1,3	1,9
<b>Грамотрицательные палочки</b>	27	9,1	13,1
<i>E.coli</i>	1	0,3	0,5
<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.mariorubra</i> *	2	0,7	1,0
<i>E.cloacae</i>	2	0,7	1,0
<i>P.aeruginosa</i>	4	1,3	1,9
<i>P.putida</i>	1	0,3	0,5
<i>Burkholderia cepacia</i> ****	5	1,7	2,4
<i>A.faecalis</i>	2	0,7	1,0
<b>Анаэробные микроорганизмы</b>	72	24,2	35,0
<b>Грамположительные кокки</b>	5	1,7	2,4
<i>Peptococcus spp.</i>	5	1,7	2,4
<b>Грамположительные палочки</b>	66	22,2	32,0
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2	0,7	1,0
<i>Cutibacterium acnes</i> *****	64	21,5	31,1
<b>Грамположительные споровые палочки</b>	0	0,0	0,0
<b>Грамотрицательные палочки</b>	1	0,3	0,5
<i>Fusobacterium spp.</i>	1	0,3	0,5
<b>Грамотрицательные кокки</b>	0	0,0	0,0
<b>Грибы</b>	7	2,3	3,4
<i>C.albicans</i>	2	0,7	1,0
<i>Rhodotorula spp.</i>	2	0,7	1,0
<i>A.niger</i>	3	1,0	1,5

Примечание:

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

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

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

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

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

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

Из таблицы 47 видно, что 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 короткие палочки (2,0%) и палочки (9,1%). Внутри грамположительных кокков опережали по факту выделения: *S.epidermidis* (25,8%), *S.aureus* (4,4%), *S.haemolyticus* (2,0%), *S.mitis* (4,7%). В кругу анаэробных возбудителей доминировала *C.acnes* (21,5%). Отмечали единичный рост дрожжевых и плесневых грибов. ИВ микроорганизмов показал преимущество аэробных над анаэробными возбудителями (105,8% и 35,0% соответственно), грамположительных кокков над грамотрицательными палочками (70,0% и 13,1% соответственно). ВГИК характеризовалась чаще мономикробностью, чем полимикробностью (66,5% и 33,5% соответственно;  $p < 0,001$ ). Особенности полимикробности ВГИК представлены в таблице 48.

Таблица 48 – Характеристики ассоциантов в полимикробных гемокультурах у внегоспитальных больных

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

В таблице 48 показаны полимикробные гемокультуры и их характер. В одном флаконе с кровью давали рост два, три и четыре разных микроорганизма (75,4%, 18,8% и 5,8% соответственно). Ассоциации полимикробности отличались сообществом, 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%). Преобладающие данные по доле количеству и ИВ фиксировали у аэробов (74,0% и 168,1% соответственно), в три раза реже анаэробы участвовали в полимикробности (23,9% и 55,1% соответственно), в единичных случаях отмечали грибы (7,2% и 3,1% соответственно). Анализировали частоту

возникновения ВГИК у больных при различных терапевтических заболеваниях (Таблица 49).

Таблица 49 – ИК у внегоспитальных больных при терапевтических заболеваниях

Болезни систем	Показатели внегоспитальной инфекции кровотока								Всего штаммов возбудителей	
	Всего больных	в т. ч. больных ИК		Всего анализов	в т. ч. положительных гемокультур		в т. ч. полимикробных гемокультур			
		абс. (% или доля)	95% ДИ		абс. (% или доля)	95% ДИ	абс. (% или доля)	95% ДИ	абс. (%)	95% ДИ
кровообращения	8	1 (1/8)	–	2	2 (2/2)	–	0 (0/2)	–	2 (0,7)	0,2-2,4
органов дыхания	30	18 (60,0)	42,3-75,4	24	20 (83,3)	64,1-93,3	5 (25,0)	11,2-46,9	27 (9,1)	6,3-12,9
кожи и подкожной клетчатки	158	75 (47,5)	39,8-55,2	100	80 (80,0)	71,1-86,7	29 (36,3)	26,6-47,2	119 (40,0)	34,7-45,7
полости рта	45	26 (57,8)	43,3-71,0	36	32 (88,9)	74,7-95,6	9 (28,1)	15,6-45,4	43 (14,4)	10,9-18,9
мочеполовой	10	6 (60,0)	31,3-83,2	7	6 (6/7)	–	2 (2/6)	–	10 (3,4)	1,8-6,1
костно-мышечной	8	1 (1/8)	–	3	1 (1/3)	–	0 (0/1)	–	1 (0,3)	0,1-1,9
органов пищеварения	10	3 (3,0)	10,8-60,3	3	3 (3/3)	–	2 (2/3)	–	5 (1,7)	0,7-3,9
осложнения пластической хирургии	9	9 (9/9)	–	10	10 (100,0)	72,2-100,0	3 (30,0)	10,8-60,3	15 (5,0)	3,1-8,2
лихорадка неясного происхождения	104	44 (42,3)	33,3-51,9	65	52 (80,0)	68,7-87,9	19 (36,5)	24,8-50,1	75 (25,2)	20,6-30,5
Всего	382	183 (48,0)	42,9-52,9	250	206 (82,4)	77,2-86,6	69 (33,5)	27,4-40,2	297 (100,0)	

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

Из таблицы 49 видно, что ВГИК осложняла большинство основных заболеваний у внегоспитальных больных: органов дыхания и мочеполовой системы (60,0%), после контурной пластики (100%), полости рта (57,8%), кожи и подкожной клетчатки (47,5%). Чаще получали гемокультуру и выделяли микроорганизмы из крови при заболеваниях: кожи и подкожной клетчатки (40,0%), ЛНП (25,2%), полости рта (14,4%), органов дыхания (9,1%), после контурной пластики (5,0%). Полимикробные ВГИК чаще регистрировали при: лихорадке (36,5%), заболеваниях

кожи и подкожной клетчатки (36,3%). Микробный пейзаж ассоциантов полимикробных гемокультур представлен в таблице 50.

Таблица 50 – Видовой состав ассоциантов полимикробных гемокультур у больных с ВГИ

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n= 159)		Индекс встречаемости С, % (n=69)
	абс.	%	
<b>Аэробные микроорганизмы</b>	116	73,0	168,1
<b>Грамположительные кокки</b>	69	43,4	100,0
<i>S.aureus</i>	7	4,4	10,1
<i>S.epidermidis</i>	36	22,6	52,2
<i>S.haemolyticus</i>	3	1,9	4,3
<i>S.hominis</i>	2	1,3	2,9
<i>S.saprophyticus</i>	3	1,9	4,3
<i>S.auricularis</i>	1	0,6	1,4
<i>M.luteus</i>	1	0,6	1,4
<i>S.mitis</i>	8	5,0	11,6
<i>S.mutans</i>	1	0,6	1,4
<i>S.salivarius</i>	2	1,3	2,9
<i>E.faecalis</i>	3	1,9	4,3
<i>E.faecium</i>	2	1,3	2,9
<b>Грамположительные палочки</b>	20	12,6	29,0
<i>C.ulcerans</i>	1	0,6	1,4
<i>C.bovis</i>	4	2,5	5,8
<i>C.minutissimum</i>	2	1,3	2,9
<i>C.pseudotuberculosis</i>	1	0,6	1,4
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	1	0,6	1,4
<i>C.xerosis</i>	1	0,6	1,4
<i>Corynebacterium spp.</i>	6	3,8	8,7
<i>Tsukamurella paurometabola</i> ****	1	0,6	1,4
Грам (+) аэробная	1	0,6	1,4
<i>Nocardia spp.</i>	1	0,6	1,4
<i>Actinomyces spp.</i>	1	0,6	1,4
<b>Грамположительные споровые палочки</b>	2	1,3	2,9
<i>B.cereus</i>	1	0,6	1,4
<i>B.subtilis</i>	1	0,6	1,4
<b>Грамотрицательные кокки и кокко-бактерии</b>	5	3,1	7,2
<i>N.flavescens</i>	1	0,6	1,4
<i>Branhamella catarrhalis</i> **	1	0,6	1,4
<i>A.lwoffii</i>	3	1,9	4,3
<b>Грамотрицательные палочки</b>	20	12,6	29,0
<i>E.coli</i>	1	0,6	1,4
<i>S.marcescens</i>	1	0,6	1,4
<i>S.liquefaciens</i>	4	2,5	5,8
<i>S.mariorubra</i> *	2	1,3	2,9
<i>E.cloacae</i>	2	1,3	2,9
<i>P.aeruginosa</i>	4	2,5	5,8
<i>P.putida</i>	1	0,6	1,4

Продолжение таблицы 50

Виды микроорганизмов	Количество штаммов (n= 159)		Индекс встречаемости С, % (n=69)
	абс.	%	
<i>Burkholderia cepacia</i> ***	4	2,5	5,8
<i>A.faecalis</i>	1	0,6	1,4
<b>Анаэробные микроорганизмы</b>	38	23,9	55,1
<b>Грамположительные кокки</b>	4	2,5	5,8
<i>Peptococcus spp.</i>	4	2,5	5,8
<b>Грамположительные палочки</b>	33	20,8	47,8
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2	1,3	2,9
<i>Cutibacterium acnes</i> *****	31	19,5	44,9
<b>Грамотрицательные палочки</b>	1	0,6	1,4
<i>Fusobacterium spp.</i>	1	0,6	1,4
<b>Грибы</b>	5	3,1	7,2
<i>C.albicans</i>	1	0,6	1,4
<i>Rhodotorula spp.</i>	1	0,6	1,4
<i>A.niger</i>	3	1,9	4,3

Примечание:

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

\*\**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*).

Из таблицы 50 видно, что в числе ассоциантов полимикробных гемокультур преобладали аэробные грамположительные кокки (43,4%). ИВ подтвердил аналогичное лидерство (100,0%). Кроме аэробных бактерий участниками полимикробности были анаэробные бактерии (23,9%) и грибы (3,1%). К ведущим ассоциантам по ИВ отнесли микроорганизмы: *S.epidermidis* (52,2%), *S.aureus* (10,1%), *S.mitis* (11,6%), *C.bovis* (5,8%), *S.liquefaciens* (5,8%), *P.aeruginosa* (5,8%), *B.cepacia* (5,8%), *C.acnes* (44,9%), *A.niger* (4,3%).

Таким образом, ВГИК была диагностирована у 48,0% терапевтических больных, регистрировалась чаще у женщин молодого возраста. Гемокультуру получили в 42,8% случаев с выделением 297 штаммов микроорганизмов, среди которых присутствовали аэробные (73,4%), анаэробные бактерии (24,2%) и грибы (2,4%). Из числа аэробов лидировал *S.epidermidis* (25,8%) и у анаэробов – *C.acnes* (21,5%). ВГИК характеризовалась полимикробностью гемокультур (33,5%) и число ассоциантов доходило от двух до 4-х в одной пробе крови. Чаще ВГИК осложняла основное заболевание: органов дыхания и мочеполовой системы, после

контурной пластики, полости рта, кожи и подкожной клетчатки.

#### 4.1.3. Сопоставление особенностей госпитальной и внегоспитальной инфекций кровотока

В задачу сравнительного анализа ГИК и ВГИК у терапевтических больных входила оценка особенностей ИК в разных группах больных (госпитальные и внегоспитальные).

Для изучения проблемы ИК при терапевтической патологии обследовано 1230 больных, включая 68,9% госпитальных и 31,1% внегоспитальных. Из 2075 проб крови 76,8% приходилось на госпитальных и 23,2% – на внегоспитальных больных. ГИК диагностировали у 38,3%, а ВГИК – у 48,0% больных. Количество больных и проб крови было больше у госпитальных, а гемокультуру чаще получили у внегоспитальных больных. Сравнили гендерные и возрастные данные госпитальных и негоспитальных больных (Таблица 51).

Таблица 51 – Возрастные и гендерные особенности госпитальных и внегоспитальных больных

Показатели, n (%)	ИК (n=508)	Госпитальная (n=325)	Негоспитальная (n=183)	P
1-я группа (10–44 лет)	329 (64,8%)	193 (59,4%)	136 (74,3%)	< 0,001
2-я группа (45–60 лет)	137 (27,0%)	100 (30,8%)	37 (20,2%)	0,010
3-я группа (61–75)	38 (7,5%)	28 (8,6%)	10 (5,5%)	0,20
4-я группа (76–90 лет)	4 (0,8%)	4 (1,2%)	0 (0,0%)	0,32*
мужчины	229 (45,1%)	166 (51,1%)	63 (34,4%)	< 0,001
женщины	279 (54,9%)	159 (48,9%)	120 (65,6%)	

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$

Из таблицы 51 видно, что ВГИК чаще осложняла заболевания у женщин, чем у мужчин (65,6% и 34,4% соответственно), а ГИК – регистрировалась в равных долях у мужчин и женщин. У пациентов возраста до 44 лет чаще диагностировали ВГИК, чем ГИК (74,3% и 59,4% соответственно;  $p < 0,001$ ). У больных с 45 до 75 лет в 1,5 раза чаще возникала ГИК, чем ВГИК, а в возрасте старше 75 лет регистрировали только ГИК. Микробиологический пейзаж ГИК и ВГИК представлен на рисунке 39. Сравнение этиологии ГИК и ВГИК показало, что определяли чаще грамположительные (87,1% и 86,2% соответственно), реже – грамотрицательные (11,8% и 11,4% соответственно) бактерии. Грибы в 2 раза чаще



выделяли из крови при ВГИК, чем при ГИК (2,4% и 1,2% соответственно) (Рисунок 27 А). При обоих вариантах ИК в равных долях и с высокой частотой были получены полимикробные гемокультуры (50,7% и 49,3% соответственно;  $p=0,81$ ) (Рисунок 27 Б).

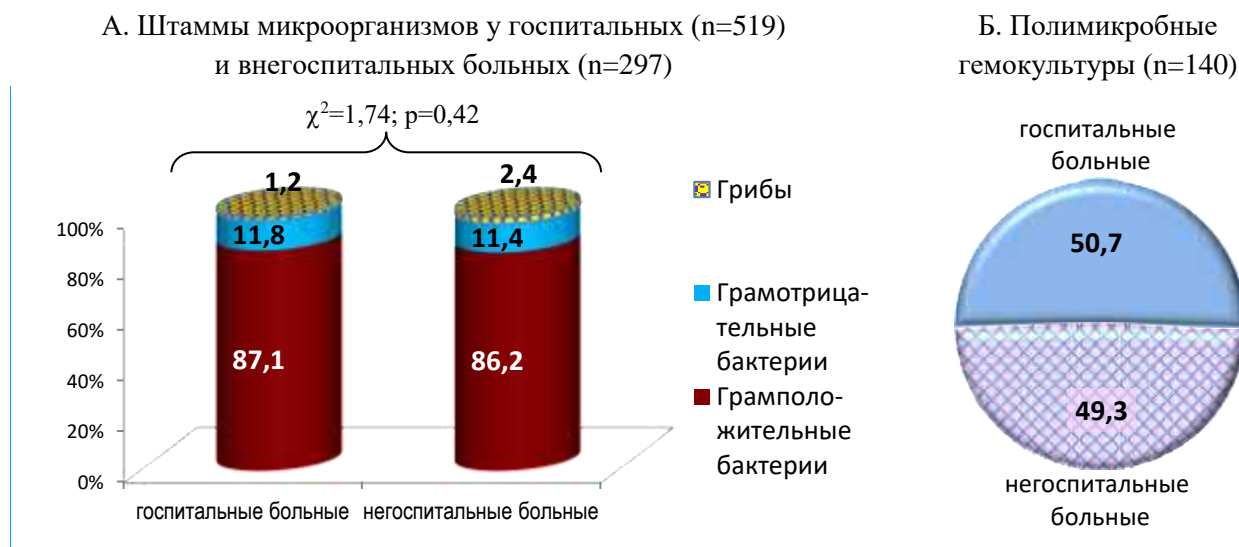


Рисунок 27 – Микробиологическая характеристика ИК у терапевтических больных

Итак, число обследованных госпитальных больных превышало в 2,2 раза количество внегоспитальных больных (68,9% и 31,1% соответственно): число проб крови от госпитальных больных превышало в 3,3 раза число проб от внегоспитальных больных (76,8% и 23,2% соответственно), а гемокультуру получили в 1,6 раза чаще у внегоспитальных, чем у госпитальных больных (48,0% и 38,3% соответственно). Молодые люди в возрасте до 44 лет чаще страдали ВГИК (74,3%), а старше 45 лет – ГИК. ВГИК чаще возникала у женщин, чем у мужчин (65,6% и 34,4% соответственно), ГИК – не имела гендерных различий. Выделение Грам+ и Грам– бактерий получали в равных долях при всех видах ИК с преобладанием грамположительных возбудителей. Грибы в 2 раза чаще вызывали ИК у внегоспитальных больных, чем у госпитальных (2,4% и 1,2% соответственно). Равное число полимикробных гемокультур при всех ИК.

#### 4.1.4. Клинический пример выделения микроорганизма из крови

У пациентки Г. в анамнезе обозначен хронический воспалительный процесс в ротовой полости и хронический эндометриоз, по поводу которых пациентка проходила длительное антимикробное лечение. Пациентка продолжительное время

(со слов пациентки) находилась в состоянии стресса. На фоне этого состояния пациентке была проведена контурная пластика в виде инъекции филлера на основе гиалуроновой кислоты в носогубную складку, после которой появились отек полости рта и затрудненное дыхание спустя 3 дня. При обращении в медицинский центр, где была проведена манипуляция, ей был поставлен диагноз – отек Квинке. Проведенное лечение инъекциями антидота гиалуроновой кислоты положительного результата не дало. Осложнение развилось в виде абсцесса. В клинике пластической хирургии было проведено дренирование абсцесса и назначено лечение в соответствии с Московскими городскими стандартами стационарной медицинской помощи (код стандарта – 73180, шифр по МКБ – к 122). Согласно назначенному лечению, пациентка принимала цефтриаксон (1,0 x 2 раза в день в/в), ципрофлоксацин (200,0 x 2 раза в день), метамизол Na 50% 2,0 в/м при болях, полоскание полости рта растворами антисептиков. В удовлетворительном состоянии пациентка была выписана из стационара. Отеки, зуд и высыпания регрессировали полностью. Сохранилась отечность слизистой оболочки ротоглотки в точке выхода слюнных желез. Результаты общего клинического исследования крови свидетельствовали о наличии хронического воспалительного процесса. На фоне нормальных гематологических показателей клинического анализа крови: гемоглобин, эритроциты, цветовой показатель, общее количество лейкоцитов были отмечены: нейтропения, моноцитоз, эозиноцитоз и лимфоцитоз. Палочкоядерные нейтрофилы – 1,0 (1,0–6,0), сегментоядерные нейтрофилы – 34,0 (47,0–72,0), эозинофилы – 5,0 (0,5–5,0), моноциты – 12,0 (3,0–11,0), лимфоциты – 48 (19–37). Показатели иммунологического анализа крови были в норме. Общий иммуноглобулин E (IgE) (A) 2,690 (1.000–87.000). При микроскопии мазка лейкоцитарного слоя крови, окрашенного по Граму, были выявлены грамположительные кокки яйцевидной формы, укладывающиеся парами и тетрадами в значительном количестве и дрожжевые клетки в единичном количестве, которые представлены на рисунке 30. Тромбоциты находились свободно и в агрегированном состоянии в исследуемом мазке. При бактериологическом посеве крови выросли колонии белого цвета, без гемолиза, слизистые, плотно спаенные и трудно снимаемые с агаровой

поверхности. Мазки из колоний были окрашены по Граму (Рисунок 28).

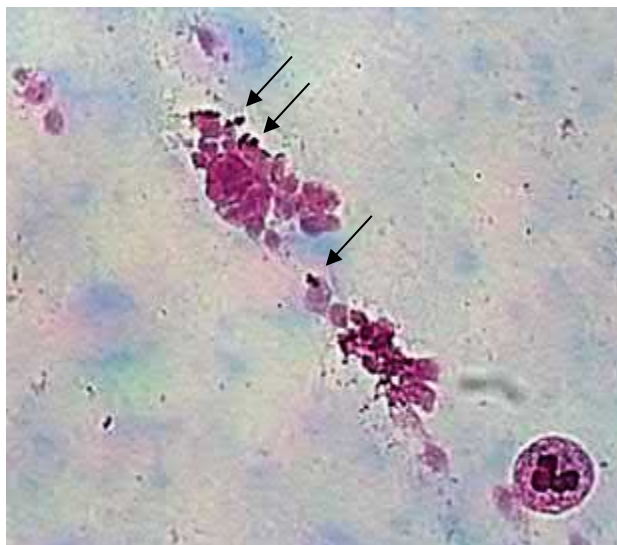


Рисунок 28 – Микрофотография *Rothia mucilaginosa* в мазке лейкоцитарного слоя крови (окрашивание по Граму) (Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия), иммерсионный объектив A-Plan 100×1.25, окуляр 10×)

Микроскопия колоний показала наличие грамположительных кокков яйцевидной формы, располагающихся парами и тетрадами (Рисунок 29).

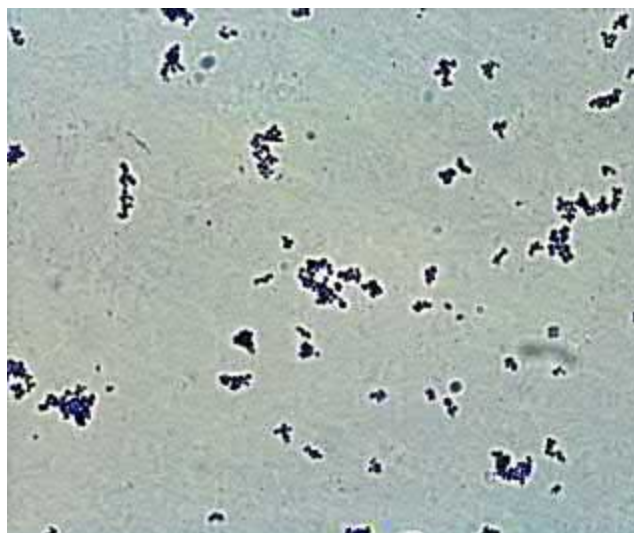


Рисунок 29 – Микрофотография мазка *R. mucilaginosa* (окрашивание по Граму, чистая культура) (Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия), иммерсионный объектив A-Plan 100×1.25, окуляр 10×)

Выросшие грамположительные кокки были коагулазонегативными. Идентификацию колоний провели масс-спектрометрическим методом с применением времяпролетного масс-спектрометра BioMerieux VITEK MS MALDI-ToF («bioMerieux», Франция), которая показала наличие *R. mucilaginosa* (Рисунок 30).

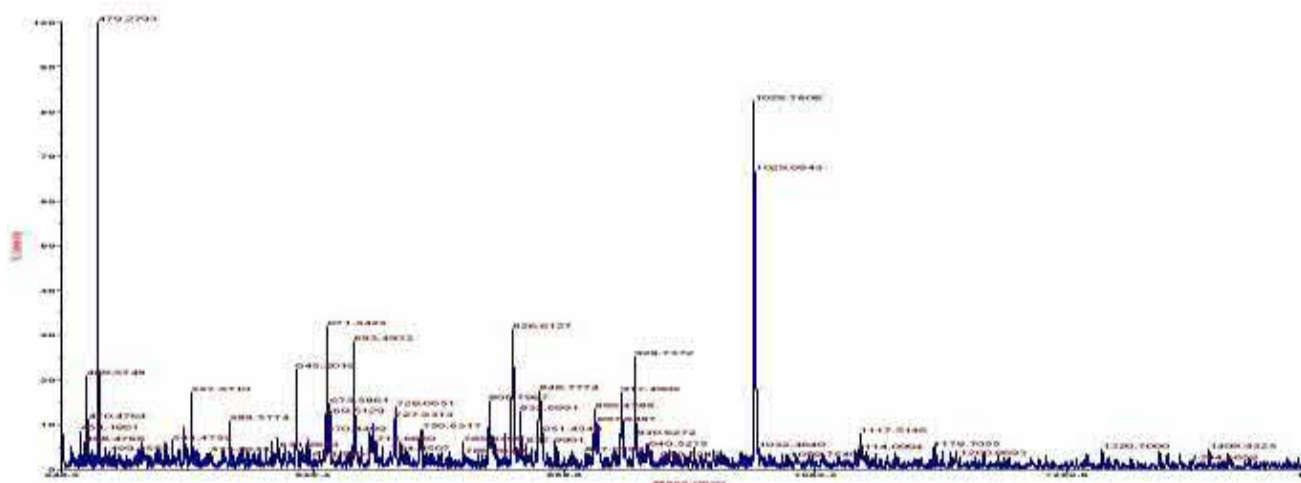


Рисунок 30 – Масс-спектрометрический профиль *R. mucilaginosa*

Результаты, полученные после амплификации гена *16S rRNA*, прямого секвенирования амплифицированных фрагментов и сопоставления с международной on-line базой данных EMBL/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore>), подтвердили принадлежность выросших микроорганизмов к виду *Rothia mucilaginosa*.

#### 4.1.5. Визуализация инфекций кровотока у терапевтических больных

Мировые руководства по микробиологии рекомендуют проводить микроскопию мазка крови, как важный диагностический прием на преаналитическом этапе и дополнительный тест к бактериологическому исследованию крови [312] с использованием несколько техник приготовления мазков [88, 312]. Приказ № 535 регламентирует микроскопическое исследование крови в виде «толстой» капли [89]. Разработанная техника приготовления мазка из лейкоцитарного слоя пробы крови позволяла диагностировать бактериальные, грибковые и паразитарные инфекции [126, 196, 240, 253, 313]. По результатам микроскопии мазков крови ставили диагноз и назначали эмпирическую терапию.

В наших исследованиях просмотрено 1287 мазков проб крови терапевтических больных, при микроскопии которых обнаружены микроорганизмы в 971 мазке (75,4%), включая при положительной 376 (38,7%) и отрицательной гемокультурах 595 (61,3%). Диагностические характеристики микроскопического метода представлены в таблице 52.

Таблица 52 – Операционные характеристики микроскопического метода (%)

Диагностические характеристики	Результаты
Чувствительность	38,7%
Специфичность	74,4%
Прогноз положительного результата	82,3%
Прогноз отрицательного результата	28,3%
Точность метода	47,5%
Относительный риск	1,1

Из таблицы 52 видна высокая диагностическая специфичность теста (74,4%). Предсказательная ценность положительного результата в 82,3% свидетельствует о наличии инфекции в крови при положительных находках в мазках. Относительный риск более 1 подтверждает полезность применения микроскопии на первом этапе диагностики и устанавливает диагностическую связь между микроскопией крови и вероятностью инфекции в крови по положительным результатам микроскопического метода. Микроскопический метод позволяет характеризовать обнаруженный организм по морфологическим и тинкториальным признакам.

Для оценки эффективности микроскопического метода мазков лейкоцитарного слоя анализировали 339 мазков внегоспитальных пациентов. Микроорганизмы были обнаружены в 329 (97,1%) и не обнаружены в 10 мазках (2,9%) (Таблица 53).

Таблица 53 – Обнаруженные микроорганизмы в мазках крови

Мазки крови (n=329)	Микроорганизмы		
	бактерии	ассоциация бактерий и грибов	грибы
абс.	102	220	7
%	31,0	66,9	2,1
95% ДИ	26,2-36,2	61,6-71,7	1,0-4,3

Из таблицы 53 видно, что ассоциации бактерий с грибами в 2,2 раза чаще обнаруживали, чем одни бактерии или грибы в мазках крови (66,9%, 31,0% и 2,1% соответственно). Бактериально-грибковый симбиоз приобретает патогенетическое значение в настоящее время. Отдельные грибы реже видны в мазках по сравнению с симбиозом их с бактериями. Диагностическое значение микроскопии мазка крови заключалось в обнаружении бактерий, дрожжевых клеток, нитей псевдомицелия гриба, ассоциации бактерий с грибами на фоне отсутствия выделения их из крови. Мазки крови представлены на рисунке (Рисунок 31 А-Е).



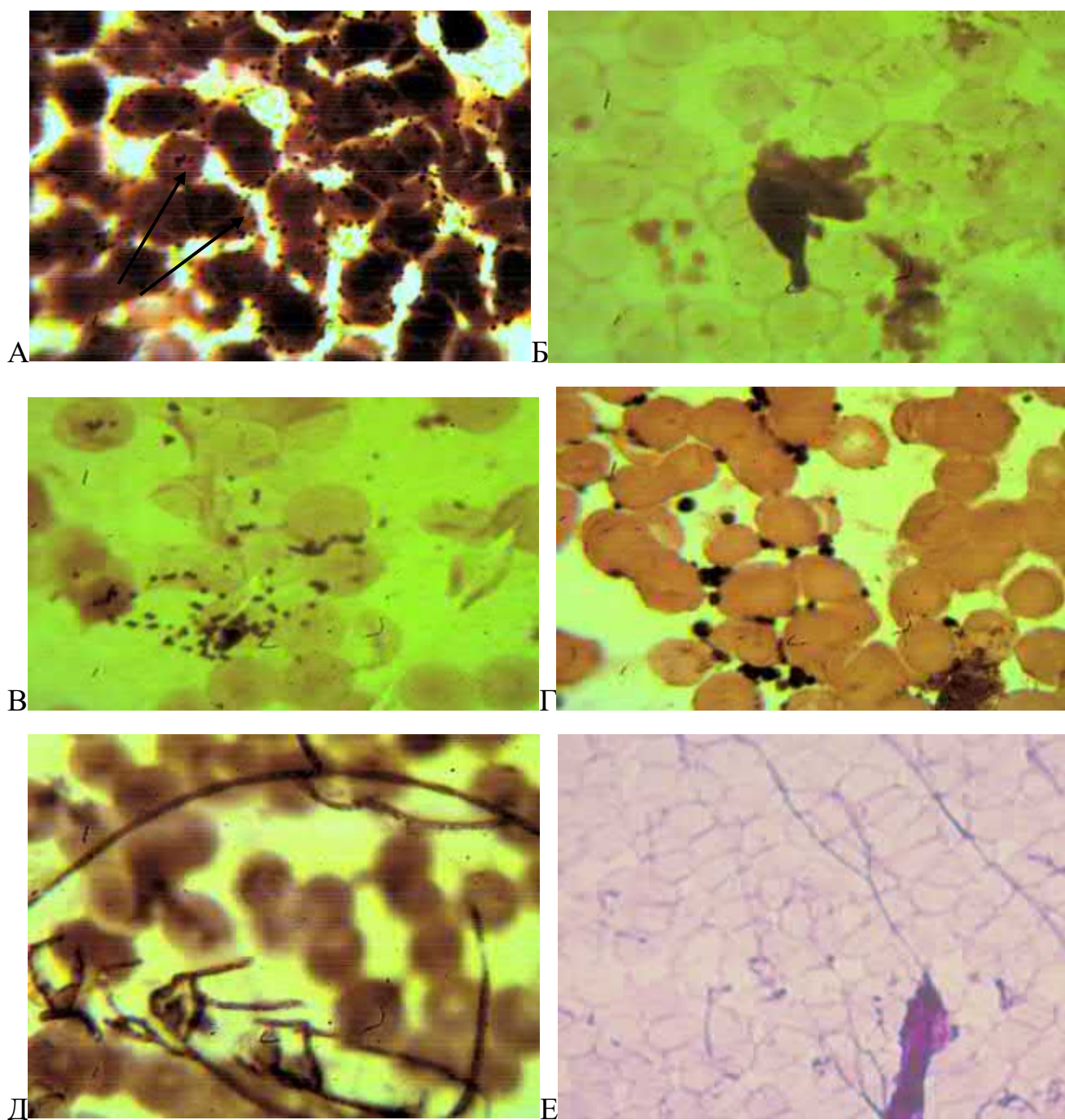


Рисунок 31 – Микрофотографии мазков лейкоцитарного слоя пробы крови (окрашивание по Граму) (Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия), иммерсионный объектив A-Plan 100×1.25, окуляр 10×)

Примечание: А - грамположительные кокки, адгезированные на эритроцитах; Б - почкующаяся дрожжевая клетка; В - грамположительные кокки и диплококки; Г - дрожжевые клетки; Д, Е – нити псевдомицелия

Элементы грибов обнаружены в 69,0% случаев. Микроскопическая техника исследования крови позволила показать наличие двух форм диморфных грибов в крови. Ценность микроскопического метода заключается в расширении диагностической информативности при ИК, в обнаружении микроорганизмов, не

дающих рост в гемокультурах. Результаты микроскопического исследования крови у больных с ИК при разных заболеваниях представлены в таблице 54.

Таблица 54 – Обнаружение микроорганизмов в мазках крови у больных ИК с разными терапевтическими заболеваниями

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

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

Из таблицы 54 видно, что чаще обнаружили 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 чаще 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%). непосредственно грибы обнаруживали у больных при остром течении ЛНП в 5,1% случаев. Обнаружение грибов в ассоциации или изолированно отмечали чаще у больных при заболеваниях кожи и подкожной клетчатки (76,8% и 1,4% соответственно) и при ЛНП (65,4% и 5,1% соответственно), чем у больных при другой терапевтической патологии. При бактериологическом посеве крови грибы не выделялись.

Таким образом, при микроскопии мазков пробы периферической крови обнаруживали микроорганизмы в крови в 75,4% случаев до получения гемокультуры,

в пределах 2-х часов с момента взятия пробы крови. При отрицательной гемокультуре диагностировали ИК микроскопическим методом в 61,3% случаев. Метод микроскопии показал чувствительность в 74,4% и прогноз положительного результата в 82,3%. В 2,2 раза чаще выявляли ассоциации бактерий с грибами (66,9%), чем только бактерии или грибы в мазках. Имеет клинико-патогенетическое значение обнаружение в мазках крови ассоциаций бактерий с грибами при заболеваниях кожи и подкожной клетчатки, патологии системы кровообращения, ЛНП и заболеваниях полости рта. Результаты микроскопического исследования крови представляют собой раннюю диагностическую информацию для клиницистов с целью назначения эмпирической антимикробной терапии.

### Резюме

Общую ИК изучали по результатам исследования крови 1230 терапевтических больных и диагностировали ИК у 41,3% больных. Из 2075 посевов крови гемокультуру получили в 30,9% случаях при взятии 1,7 пробы крови на одного больного. Этиологию ИК изучали на 642 гемокультурах и 816 выделенных штаммах микроорганизмов. Группу аэробов возглавляли грамположительные кокки (57,8%) с ведущими видами *S.epidermidis* и *S.mitis*. ИК терапевтических больных характеризовалась полимикробностью до 21,8% случаев с участием от 2-х до 4-х ассоциантов. ГИК изучали на основе исследования крови 848 госпитальных пациентов и диагностировали ИК у 38,3% больных. При выполнении 1594 исследований крови получили гемокультуру у в 27,4% случаев. Этиологическую характеристику госпитальной ИК изучали на 519 штаммах выделенных микроорганизмов.

Из числа аэробных микроорганизмов чаще получали рост грамположительных кокков, среди которых лидировал *S.epidermidis*. Этиология ГИК характеризовалась полимикробностью в 16,3% случаев с двумя или тремя ассоциантами в симбиозе. При ВГИ исследовали кровь 382 внегоспитальных пациентов и диагностировали ИК у 48,0% пациентов. При посеве 481 пробы крови получили гемокультуру в 42,8% случаях. Этиологию ВГИК изучали на 297 выделенных штаммах микроорганизмов. Из числа аэробов лидировал



*S.epidermidis*. ВГИК характеризовалась полимикробностью гемокультур (33,5%) и число ассоциантов доходило от двух до 4-х в одной пробе крови.

При микроскопии мазков крови обнаруживали микроорганизмы в 75,4% случаев в пределах 2-х часов с момента взятия пробы крови для назначения эмпирической антимикробной терапии.

## ГЛАВА 5. ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ШТАММА

### *Aerococcus* spp. 1КР-2016

В процессе исследования нами была выделена культура микроорганизма из лейкоцитарного слоя крови пациента (Б., 36 лет, г. Ставрополь). На колумбийском агаре через 24–48 часов формировались единичные, мелкие, гладкие колонии размером менее 1 мм, с неровными краями, приподнятым центром, полупрозрачные серовато-белого цвета с небольшой зоной гемолиза (Рисунок 32).

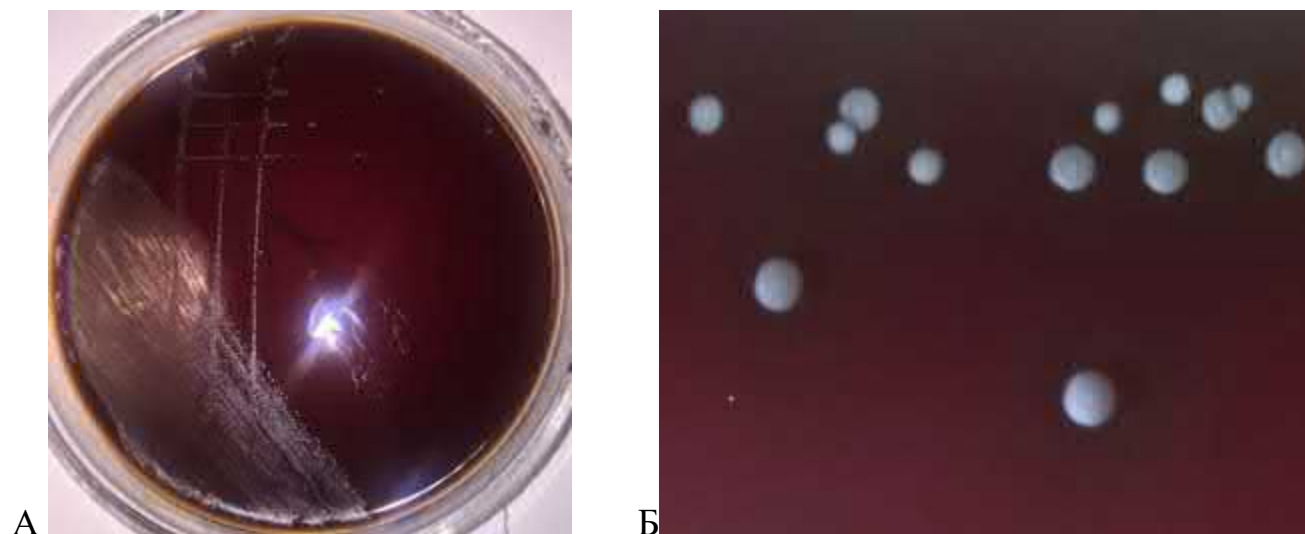


Рисунок 32 - Колонии *Aerococcus* spp. 1КР-2016 на Columbia Agar Base (Conda, Испания)

Примечание: А – визульно; Б – в стереомикроскопе Stereo Discovery, V12, Carl Zeiss Microscopy, GmbH; диапазон увеличений - 8x - 100x

В мазке, окрашенном по Граму, были грамположительные кокки, образующие тетрады (Рисунок 33).

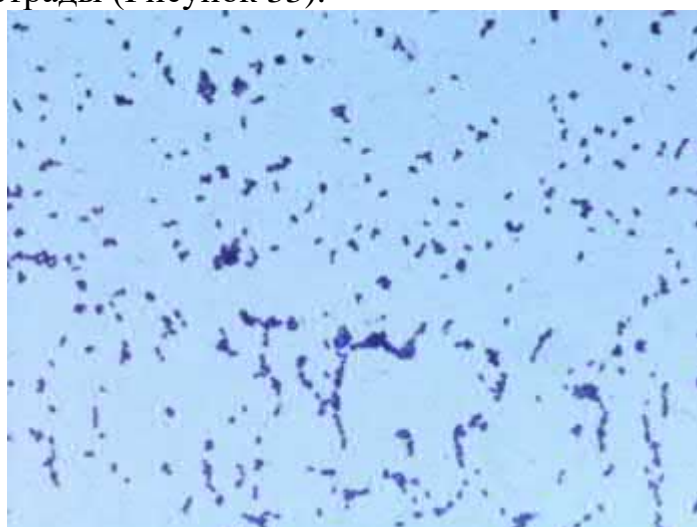


Рисунок 33 - Микрофотография мазка *Aerococcus* spp. 1КР-2016, окрашенного по Граму (световой микроскоп Axio Scope A1 (объектив EC Plan-NEOFLUAR 100 x 1,3; окуляр PI 10 × 23 Br foc (Carl Zeiss, Германия))

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. Нуклеотидные последовательности *16S rRNA* выровнены с помощью MUSCLE и конкатенированы. Реконструкция филогении осуществлялась по алгоритму Maximum Likelihood, реализованного в программном обеспечении raXML, с использованием модели GTR+CAT (<http://www.ch.embnet.org/raxml-bb/>). Белок-кодирующие области в геномах в соответствии с аннотациями, представленными в базах данных, были кластеризованы в группы ортологов с применением программного обеспечения OrthoMCL и со стандартными настройками. В результате был получен коровый протеом из 543 консервативных белковых групп ортологов, входящие в которые гены присутствовали в геноме в одной копии. Аминокислотные последовательности были выровнены с помощью MUSCLE и конкатенированы. Филогенетическая реконструкция выполнена с помощью программного обеспечения RapidNJ. Средняя нуклеотидная идентичность между геномами была рассчитана с помощью подхода ANIb с помощью онлайн-сервиса JspeciesWS.

Драфтовый геном штамма *Aerococcus* spp. 1KP-2016 депонирован в DBJ/EMBL/GenBank под номером NEEY0000000. В результате сборки получено 119 контигов, общая длина геномной последовательности составляла 2042438 п.н. и GC-состав равен 38,5%. Последовательность *16S rRNA* штамма *Aerococcus* spp. 1KP-2016 на 98,6–98,7% идентична последовательностям *Aerococcus group viridans* и *A.urinaeequi* (Рисунок 34). Эти значения близки к порогу дифференциации бактериальных видов. Нуклеотидная идентичность является общепринятым критерием различия видов, между описанным геномом и общедоступными геномами *A. group viridans* и *A.urinaeequi* значительно меньше

чем 96% (Таблица 55), что явно отделяет *Aerococcus* spp. 1KP-2016 от этих видов.

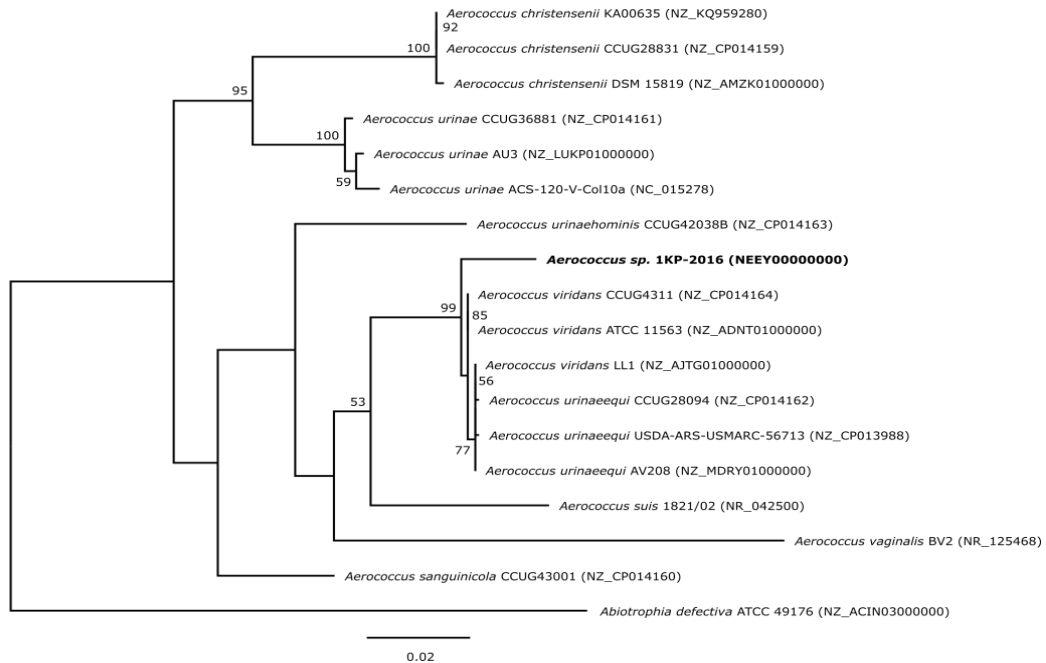


Рисунок 34 – Филогенетическое дерево последовательностей генов *16S rRNA*  
 Примечание: Планка шкалы представляет 0,02 замены на нуклеотидную позицию. Номер в базе данных Genbank дается рядом с именем штамма. Цифры в узлах дерева определяют уровень поддержки, полученный с помощью метода rapid bootstrap. Помечены только узлы с уровнями загрузки выше 50%

Таблица 55 – Средняя идентичность генома между *Aerococcus* spp. 1KP-2016 и наиболее похожими опубликованными геномами

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

Реконструкция филогении, основанная как на генах *16S rRNA*, так и на генах, кодирующих белок, позиционирует *Aerococcus* spp. 1КР-2016 как вид, который близко связан, но отличается от клада *A. group viridans* и *A. urinaeequi* (Рисунок 35).

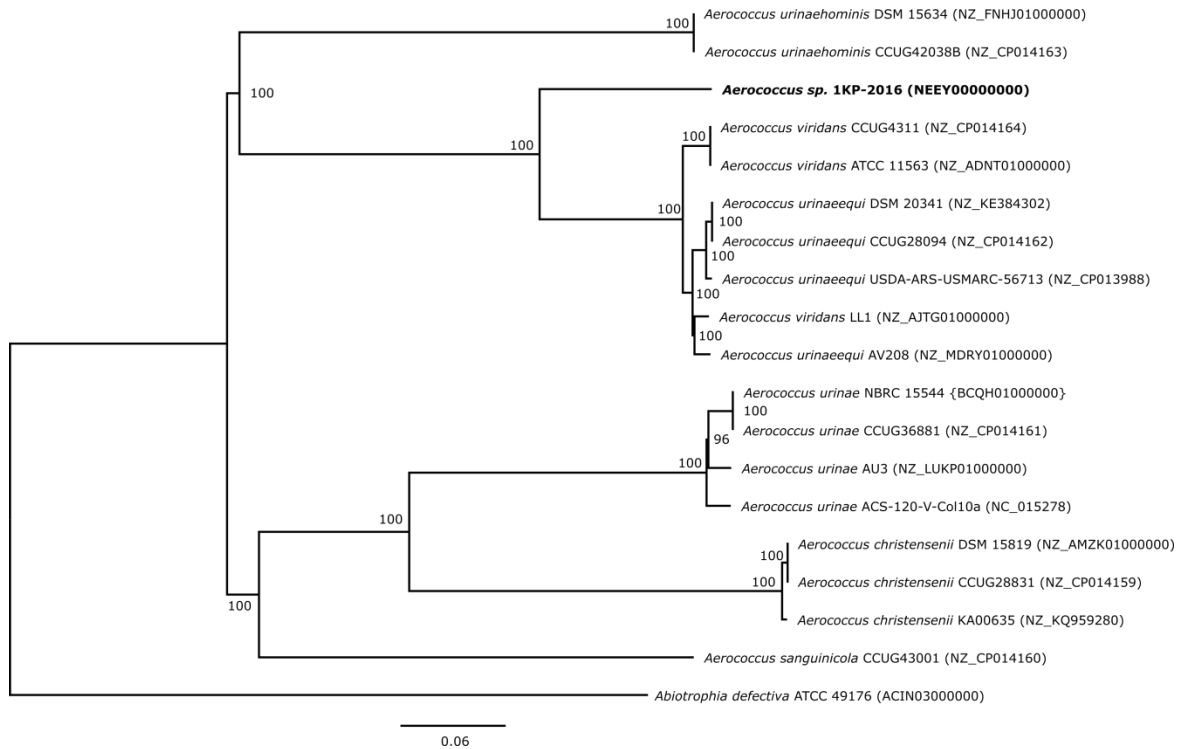


Рисунок 35 – Филогенетическое дерево конкатенированных последовательностей 543 косервисированных белков

Примечание: Шкала представляет 0,06 позиций аминокислотных замен. Номер в базе данных Genbank рядом с именем штамма. Цифры в узлах дерева определяют уровень поддержки, полученный с помощью метода rapid bootstrap. Корень дерева находится в средней точке наиболее длинного пути

Генотипические особенности изученного штамма позволяют заключить, что выделенный из крови штамм представляет собой новый вид рода *Aerococcus*.

Штамм *Aerococcus* spp. 1КР-2016 депонирован в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск) (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора).

## **ГЛАВА 6. ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ У ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ И ИХ ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРИ ИНФЕКЦИИ КРОВотоКА**

При ИК возникает воспалительная реакция, которая сопровождается отклонениями гематологических показателей и биосинтезом ряда белков, получивших название «белков острой фазы» или «острофазовые реактанты». «Белки острой фазы» разделены на «позитивные» – повышающие свою активность при воспалении, «негативные» – снижающие свои количественные уровни, «нейтральные» – концентрация которых не изменяется. К общепринятым диагностическим лабораторным маркерам относят гематологические и белковые показатели крови [71, 225].

### **6.1. Гематологические маркеры**

Гематологические маркеры изучали на показателях 319 клинических анализов крови от 231 больного, включая 179 анализов от 157 больных с ИК и 140 анализов от 74 больных без эпизодов ИК.

#### ***Эритроциты***

Согласно литературным данным в кровотоке между бактериями и эритроцитами происходят противоположные взаимодействия. Эритроциты обладают бактерицидной активностью против бактерий благодаря своему уникальному физико-химическому механизму. Они прикрепляются своей мембраной, заряженной трибоэлектрическим зарядом при трении, к бактериям, а последние проникают внутрь и гибнут от окисления кислородом. Эритроциты не переваривают их, выбрасывают в кровоток, процесс разрушения и переваривания убитых бактерий осуществляется в печени и селезенке [110, 274, 275]. С другой стороны бактерии обладают антигемоглобиновой активностью. Бактерии проникают внутрь эритроцитов, меняют структуру гемоглобина, утилизируют железо для метаболизма и эритроцит разрушается. Эритроциты проявляют активность при ИК и количество их меняется в виде: эритроцитопении и эритроцитоза.

В наших исследованиях полученные данные сопоставляли с референтными показателями крови. Отклонения показателей эритроцитов в 16,8% случаев в 179

анализах крови у больных с ИК показали эритроцитоз и эритропению в равных долях (50,0%). При отсутствии ИК большинство показателей эритроцитов было в норме (71,4%) и отклонения выявили эритропению (67,5%). Для оценки диагностической роли отклонений показателей эритроцитов при ИК определили аналитические характеристики (Таблица 56).

Таблица 56 – Операционные характеристики отклонений количества эритроцитов при ИК (%)

Диагностические характеристики	Результаты
Чувствительность	22,0%
Специфичность	79,0%
Прогноз положительного результата	57,0%
Прогноз отрицательного результата	44,0%
Точность метода	47,0%

Из таблицы 56 видно, что на фоне низкой чувствительности теста (22,0%) заметна высокая его специфичность (79,0%). Нормальные показатели эритроцитов с высокой долей вероятности соответствуют отсутствию инфекции в кровотоке, а отклоненные показатели эритроцитов в 57,0% случаев свидетельствуют о наличии ИК. Далее изучили отклонения показателей эритроцитов у больных при терапевтических заболеваниях (Таблица 57).

Таблица 57 – Отклонения показателей эритроцитов у больных ИК при терапевтических заболеваниях

Заболевания систем организма	Группа ИК(+) (n=179)		Группа ИК(-) (n=140)		p
	Отклонения (n=30)		Отклонения (n=40)		
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Кровообращения	13 (44,7)	27,4-60,8	3 (7,5)	2,6-19,9	< 0,001
Пластическая хирургия	2 (6,7)	1,8-21,3	2 (5,0)	1,4-16,5	1,0*
Кожи и подкожной клетчатки	1 (3,3)	0,6-16,7	8 (20,0)	10,5-34,8	0,068*
Костно-мышечной	1 (3,3)	0,6-16,7	2 (5,0)	1,4-16,5	1,0*
Мочеполовой	0 (0,0)	0,0-11,4	1 (2,5)	0,4-12,9	1,0*
Полости рта	9 (30,0)	16,7-47,9	14 (35,0)	22,1-50,5	0,66
Лихорадка	4 (13,3)	5,3-29,7	10 (25,0)	14,2-40,2	0,23

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$

Из таблицы 57 видно, что ИК инициировала отклонения эритроцитов у больных с заболеваниями органов кровообращения чаще, чем наблюдали в случаях отсутствия ИК (44,7% и 7,5% соответственно;  $p < 0,001$ ). Реже отмечали отклонения показателей при заболевании полости рта (30,0%), лихорадке (13,3%).

При анализе отклонений показателей эритроцитов при заболеваниях органов кровообращения оказалось, что отклонения показателей эритроцитов наиболее часто выявляли при миокардите (46,2%), реже – при ИЭ (23,1%) и в равных долях при ревматизме и ВПС (15,4%). Исследование особенностей микроорганизмов, влияющих на эритроциты, выявило, что грамположительные бактерии активнее адгезируются на эритроцитах, поэтому дальнейшим этапом была оценка отклонений эритроцитов при разных видах ИК (Таблица 58).

Таблица 58 – Отклонения показателей эритроцитов при различных ИК

Отклонения	Мономикробная ИК (n=123)			P
	Бактериальная (n=121)		Грибковая (n=2)	
	Грамположительная (n=105)	Грамотрицательная (n=16)	Грибы (n=2)	
Абс.	18	2	0	48*^
% или доля	17,1	12,5	0/2	
95% ДИ	11,1-25,5	3,5-36,0		
Отклонения	ИК (n=179)			0,79
	Мономикробная (n=123)		Полимикробная (n=56)	
	абс.	20	10	
%	16,3	17,9		
95% ДИ	10,8-23,8	10,0-29,8		

Примечание: при  $n \leq 10$  относительный показатель представлен простой дробью, в числителе которой приведено абс. значение, а в знаменателе – объем группы; \* – значимость точного критерия Фишера; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$ ; ^ – при сравнении грам (+) и грам (-)

Из таблицы 58 видно, что на количественную характеристику эритроцитов в крови влияли больше бактерии, чем грибы (16,5% и 0,0% соответственно). Грамположительная ИК вызывала отклонения в количестве эритроцитов несколько чаще, чем грамотрицательная (17,1% и 12,5% соответственно), но различия не были статистически значимы ( $p=0,48$ ). При полимикробной и мономикробной ИК в равных долях отклонения эритроцитов (17,9% и 16,3% соответственно;  $p = 0,79$ ).

Таким образом, отклонения показателей эритроцитов при ИК наблюдали в 16,8% случаев и характеризовались эритроцитозом и эритропенией в равных долях (50,0%). Прогноз положительного результата в 57,0% показал вероятность ИК при количественном отклонении эритроцитов, которые чаще отмечали при заболеваниях органов кровообращения, полости рта, лихорадке, при миокардите.



## Гемоглобин

Под воздействием эндогенных и экзогенных факторов перестраивается белковая часть гемоглобина, функциональная система эритроцита, развивается тканевая гипоксия и анемия в борьбе микроорганизмов за железо для роста [110]. Антигемоглобиновая активность микроорганизмов является причиной развития анемии у больных с инфекцией. Стафилококки с высоким уровнем антигемоглобиновой активности способны локализоваться, размножаться внутри эритроцитов, разрушая гемоглобин [110].

Полученные данные по гемоглобину у больных сравнивали с референтными значениями. При ИК изменения уровней гемоглобина наблюдали в 28,5% случаев и характеризовались существенным снижением концентрации гемоглобина в крови (92,2%;  $p < 0,001$ ). Снижение уровня гемоглобина связано с антигемоглобиновой активностью циркулирующих в крови микроорганизмов [2]. Для оценки диагностической значимости гемоглобинемии при ИК определяли аналитические характеристики гемоглобина (Таблица 59).

Таблица 59 – Операционные характеристики уровня гемоглобина при ИК (%)

Диагностические характеристики	Результаты
Чувствительность	40,2%
Специфичность	77,9%
Прогноз положительного результата	70,0%
Прогноз отрицательного результата	50,5%
Точность метода	56,7%

Диагностическая чувствительность теста составляла 40,2%. Специфичность в 77,9% свидетельствовала об отсутствии ИК при нормальной концентрации гемоглобина. Предсказательная ценность положительного результата в 70,0% обозначала наличие ИК при сниженных показателях гемоглобина.

Далее изучено клинико-патогенетическое значение измененных показателей гемоглобина при ИК у больных при терапевтических заболеваниях (Таблица 60). Показано, что при ИК концентрация гемоглобина падала при заболеваниях органов кровообращения (54,9%), лихорадке (17,6%), заболеваниях в полости рта (13,7%).

Таблица 60 – Отклонения уровня гемоглобина у больных ИК при терапевтических заболеваниях

Заболевания систем организма	Группа ИК (+) (n=179)		Группа ИК (-) (n=140)		p
	Отклонения (n=51)		Отклонения (n=54)		
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Кровообращения	28 (54,9)	41,4-67,7	12 (22,2)	13,2-34,9	< 0,001
Пластическая хирургия	3 (5,9)	2,0-15,9	3 (5,5)	1,9-15,1	1,0*
Кожи и подкожной клетчатки	1 (2,0)	0,3-10,3	7 (12,9)	6,4-24,4	0,060*
Костно-мышечной	1 (2,0)	0,3-10,3	0 (0,0)	0,0-6,6	0,48*
Мочеполовой и ЖКТ	2 (4,0)	1,1-13,2	1 (1,8)	0,3-9,8	0,61*
Полости рта	7 (13,7)	6,8-25,7	15 (27,7)	17,6-40,9	0,077
Лихорадка	9 (17,6)	9,6-30,3	16 (29,6)	19,1-42,8	0,15

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$

Далее изучили структуру заболеваний сердечно-сосудистой системы, при которых возможно снижение уровней гемоглобина. Среди кардиологических больных чаще снижалась концентрация гемоглобина в крови у больных миокардитом (28,7%). При остальных заболеваниях системы кровообращения снижение гемоглобина отмечено равных долях (17,9%). Нами проанализированы различные по этиологии ИК и уровни гемоглобина (Таблица 61). Отклонения концентрации гемоглобина при грамположительной и грамотрицательной ИК статистически не отличались (26,7% и 31,3% соответственно;  $p = 0,70$ ). Отклонения уровней гемоглобина при полимикробной случались чаще, чем при мономикробной ИК (32,1% и 26,8% соответственно).

Таблица 61 – Отклонения показателей гемоглобина у больных при различных по этиологии ИК

Отклонения	Мономикробная ИК (n=123)			p
	Бактериальная (n=121)		Грибковая (n=2)	
	Грамположительная (n=105)	Грамотрицательная (n=16)	Грибы (n=2)	
Абс.	28	5	0	0,70 <sup>^</sup>
% или доля	26,7	31,3	0/2	
95% ДИ	19,1-35,8	14,2-55,6		
Отклонения	ИК (n=179)		p	
	Мономикробная (n=123)	Полимикробная (n=56)		
	абс.	33		18
%	26,8	32,1		
95% ДИ	19,1-35,8	14,2-55,6		

Примечание: при  $n \leq 10$  относительный показатель представлен простой дробью, в числителе которой приведено абс. значение, а в знаменателе – объем группы; <sup>^</sup> – при сравнении грам (+) и грам (-)

Таким образом, отклонения концентрации гемоглобина при ИК в 28,5% случаев характеризовались снижением (92,2%). При сниженных показателях гемоглобина существует вероятность ИК в 70,0% случаев. Снижались уровни гемоглобина у больных с заболеваниями органов кровообращения, полости рта, при лихорадке и миокардите. Снижались уровни гемоглобина в равных долях при грамположительной и грамотрицательной ИК, чаще – при полимикробной ИК.

### Лейкоциты

Лейкоциты при ИК выполняют разные функции: фагоцитируют бактерии, утилизируют чужеродные частицы, обеспечивают противоопухолевый иммунитет, участвуют в аллергических реакциях. Бактерии, попадая в организм, вызывают воспалительную реакцию, лейкоцитоз или лейкопению. При острой инфекции наблюдают повышение лейкоцитарного показателя, при хроническом воспалительном процессе – постоянно высокий уровень лейкоцитов.

Полученные в работе показатели сопоставляли с референтными. При ИК отклонения показателей лейкоцитов наблюдали в 16,2% случаев и характеризовались лейкоцитозом (82,8%), что является диагностическим показателем инфекции в кровотоке. Были анализированы диагностические характеристики отклонений лейкоцитов (Таблица 62).

Таблица 62 – Операционные характеристики лейкоцитов при ИК (%)

Диагностические характеристики	Результат
Чувствительность	22,3%
Специфичность	89,3%
Прогноз положительного результата	72,0%
Прогноз отрицательного результата	47,0%
Точность метода	51,0%

Чувствительность теста составила 22,3%, специфичность – 89,3%, что соответствовало отсутствию ИК при неизменном количестве лейкоцитов. Предсказательная ценность положительного результата в 72,0% предполагала наличие ИК при изменённых показателях. Изучали изменения показателей лейкоцитов у больных при терапевтических заболеваниях разных систем организма (Таблица 63).

Таблица 63 – Отклонения лейкоцитов у пациентов ИК при терапевтических заболеваниях

Заболевания систем организма	Группа ИК (+) (n=179)		Группа ИК (-) (n=140)		p
	Отклонения (n=29)		Отклонения (n=29)		
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Кровообращения	19 (65,5)	47,3-80,1	6 (20,7)	9,8-38,4	< 0,001
Пластическая хирургия	0 (0,0)	0,0-11,7	1 (3,4)	0,6-17,2	1,0*
Кожи и подкожной клетчатки	2 (6,9)	1,9-22,0	1 (3,4)	0,6-17,2	1,0*
ВДП	2 (6,9)	1,9-22,0	0 (0,0)	0,0-11,7	0,49*
Мочеполовая и ЖКТ	1 (3,4)	0,6-17,2	1 (3,4)	0,6-17,2	1,0*
Полости рта	2 (6,9)	1,9-22,0	13 (44,8)	28,4-62,5	0,0010
Лихорадка	3 (10,3)	3,6-26,4	7 (24,1)	12,2-42,1	0,16

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$

Видно, что лейкоцитоз у больных заболеваниями органов кровообращения чаще наблюдали при ИК, чем при отсутствии инфекции в крови (65,5% и 20,7% соответственно;  $p < 0,001$ ). Лейкоцитоз при ИК также выявляли у больных с лихорадкой (10,3%). У больных с различными кардиологическими диагнозами при ИК отмечали чаще лейкоцитоз при ИЭ (31,6%), ВПС (26,3%), миокардите (21,1%), в равных долях – при ревматизме и ИБС (10,5%). Анализ лейкоцитоза при различных ИК показал, что лейкоцитоз более характерен для грамотрицательной, чем для грамположительной ИК (56,3% и 13,3% соответственно;  $p < 0,001$ ) и для мономикробной, чем при полимикробной ИК (18,7% и 10,7% соответственно;  $p=0,18$ ) (Таблица 64).

Таблица 64 – Отклонения показателей лейкоцитов при различных ИК

Отклонения	Мономикробная ИК (n=123)			p
	Бактериальная (n=121)		Грибковая (n=2)	
	Грамположительная (n=105)	Грамотрицательная (n=16)	Грибы (n=2)	
Абс.	14	9	0	< 0,001*^
% или доля	13,3	56,3	0/2	
95% ДИ	8,1-21,1	33,2-76,9		
Отклонения	ИК (n=179)			0,18
	Мономикробная (n=123)		Полимикробная (n=56)	
абс.	23		6	
%	18,7		10,7	
95% ДИ	12,8-26,5		5,0-21,5	

Примечание: при  $n \leq 10$  относительный показатель представлен простой дробью, в числителе -приведено абс. значение, а в знаменателе – объем группы; \* – значимость точного критерия Фишера; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$ ; ^ – при сравнении грам (+) и грам (-)

Таким образом, при ИК отклонения показателей лейкоцитов определяли в 16,2% случаев и характеризовались лейкоцитозом (82,8%). При лейкоцитозе вероятность наличия ИК составляла 72,0%. При ИК чаще лейкоцитоз наблюдали у больных при заболеваниях органов кровообращения и лихорадке. У кардиологических больных при ИК лейкоцитоз чаще отмечали при ИЭ, врожденных пороках сердца, миокардите. Лейкоцитоз больше сопутствовал грамотрицательной и мономикробной, чем грамположительной ИК.

### ***Нейтрофилы***

Нейтрофилы составляют большую группу лейкоцитов, фагоцитируют чужеродные агенты. В норме в крови циркулирует около 1% нейтрофилов. При инфекции под влиянием медиаторов воспаления нейтрофилы выбрасываются в кровотоки из тканей. Нейтрофилы секретируют биологически активные вещества: интерферон – против вирусов, ацилоксиацилгидролазу – для разрушения эндотоксинов грамотрицательных бактерий, нейтрофильный кейлон – для ингибиции их собственной пролиферации, стимулируя продукцию нейтрофилов в костном мозге. При попадании микроорганизмов в кровоток нейтрофилы адгезируются на эндотелии капилляров, феномен обозначен, как «маргинация», комплемент опосредованный [46]. Фагоцитоз внутрисосудистых микроорганизмов выполняется маргинальными нейтрофилами. Для большинства грамположительных инфекций характерен нейтрофильный лейкоцитоз (нейтрофилёз), как лабораторный признак маскированной ИК. При снижении количества нейтрофилов (менее 500 кл/мкл) эндогенная микрофлора кишечного тракта и полости рта вызывает развитие инфекции и предрасположенность к микотическим осложнениям, при количестве менее 200 кл/мкл воспалительный ответ отсутствует и существует риск фатального исхода. При нейтропении больные чаще имеют проблемы в полости рта и верхних дыхательных путях.

Полученные в работе данные сопоставляли с референтными показателями. Отклонения показателей нейтрофилов при ИК в 30,2% случаев характеризовались чаще нейтрофилезом, чем нейтропенией (77,8% и 22,2% соответственно;  $p < 0,001$ ). Анализ диагностической значимости нейтрофилов представлен в таблице 65.

Таблица 65 – Критерии оценки изменения количества нейтрофилов при ИК (%)

Диагностические характеристики	Результат
Чувствительность	35,2%
Специфичность	72,9%
Прогноз положительного результата	62,4%
Прогноз отрицательного результата	46,8%
Точность метода	51,7%

Из таблицы 65 видно, что чувствительность теста составила 35,2%, специфичность в 72,9% показала отсутствие ИК при нормальном уровне нейтрофилов. Предсказательный прогноз положительного результата предполагал наличие ИК в 62,4% случаев при изменённых показателях нейтрофилов.

Далее нами был изучен нейтрофилез у больных при различной терапевтической патологии (Таблица 66). Из таблицы 66 видно, что нейтрофилез при ИК присутствовал при заболеваниях системы кровообращения (55,6%), полости рта (20,4%), кожи и подкожной клетчатки (7,4%). Установлено, что нейтрофилез при ИК и кардиологических заболеваниях был в равных долях при ИЭ и миокардите (26,7%), реже – при ревматизме (20,0%) и в равных долях при ВРС и ИБС (13,3%).

Таблица 66 – Отклонения нейтрофилов у больных ИК при терапевтических заболеваниях

Заболевания систем организма	Группа ИК (+) (n=179)		Группа ИК (-) (n=140)		p
	Отклонения (n=54)		Отклонения (n=58)		
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Кровообращения	30 (55,6)	42,4-68,0	9 (15,5)	8,4-26,9	< 0,001
Пластическая хирургия	1 (1,9)	0,3-9,8	2 (3,4)	1,0-11,7	1,0*
Кожи и подкожной клетчатки	4 (7,4)	2,9-17,6	6 (10,3)	4,8-20,8	0,74*
Костно-мышечной	2 (3,7)	1,0-12,5	0 (0,0)	0,0-6,2	0,23*
ЖКТ	3 (5,6)	1,9-15,1	0 (0,0)	0,0-6,2	0,11*
Полости рта	11 (20,4)	11,8-32,9	24 (41,4)	29,6-54,2	0,016
Лихорадка	3 (5,6)	1,9-15,1	17 (29,3)	19,2-42,0	0,010

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$

Анализ частоты нейтрофилеза у больных при различной этиологии ИК показал, что нейтрофилез наблюдали в 1,8 раза чаще при грамположительной, чем при грамотрицательной ИК (33,3% и 18,8% соответственно), но различия не достигали статистически значимого уровня ( $p=0,37$ ). Уровни отклонений

нейтрофилов при мономикробной и полимикробной ИК наблюдали в равных долях (30,9% и 28,6% соответственно) (Таблица 67).

Таблица 67 – Отклонения нейтрофилов при различных ИК

Отклонения	Мономикробная ИК (n=123)			p
	Бактериальная (n=121)		Грибковая (n=2)	
	Грамположительная (n=105)	Грамотрицательная (n=16)	Грибы (n=2)	
Абс.	35	3	0	0,37*^
% или доля	33,3	18,8	0/2	
95% ДИ	25,0-42,8	6,6-43,0		
Отклонения	ИК (n=179)			p
	Мономикробная (n=123)	Полимикробная (n=56)		
	абс.	38	16	
%	30,9	28,6		0,75
95% ДИ	23,4-39,5	18,4-41,5		

Примечание: при  $n \leq 10$  относительный показатель представлен простой дробью, в числителе которой приведено абс. значение, а в знаменателе – объем группы; \* – значимость точного критерия Фишера; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$ ; ^ – при сравнении грам (+) и грам (-)

Таким образом, отклонения показателей нейтрофилов при ИК наблюдали в 30,2% случаев и характеризовались нейтрофилезом. Существует вероятность наличия ИК при нейтрофилезе в 62,4% случаев. Выявлены отклонения нейтрофилов чаще у больных с заболеваниями органов кровообращения, полости рта, кожи и подкожной клетчатки, у кардиологических больных – при ИЭ, миокардите, ревматизме. Нейтрофилез характерен для грамположительной ИК, в равных долях – мономикробной и полимикробной ИК.

### Лимфоциты

Лимфоциты регулируют процесс запуска и остановки иммунного ответа, распознают чужеродные белки, вырабатывают иммуноглобулины, уничтожают клетки возбудителя, запоминают генетические характеристики внедрённого агента. Они участвуют в клеточном (фагоцитозе) и гуморальном (выработке антител) видах иммунитета. Лимфоциты постоянно передвигаются между кровью, тканями, лимфатическими узлами при активации антигеном, попавшим в организм. Для связывания с антигеном у лимфоцитов на мембране имеются антигенсвязывающие детерминанты, у Т-лимфоцитов имеются антиген-

распознающие рецепторы. В-лимфоциты реагируют на липополисахарид бактерий и стимулируют синтез IgM. Антиген активирует лимфоциты, которые его распознают, при связывании с антигеном лимфоциты активируются, запускают процессы пролиферации и дифференцировки, образуются антитела. Лимфоцитоз указывает на развитие воспалительного процесса и на иммунный ответ при инфекциях с длительным течением и внутриклеточным паразитированием возбудителя. Лимфопения сопровождает тяжёлые течения заболеваний с неблагоприятным прогнозом. Эндотоксин-индуцированная лимфопения характеризуется исчезновением активированных лимфоцитов, апоптозом клеток вследствие цитокин-индуцированного высвобождения кортикостероидов [20, 102]. Лимфопения является маркёром ИК в отделении реанимации и интенсивной терапии [164].

В работе полученные данные сравнивали с референтными показателями. Отклонения показателей лимфоцитов в 41,9% случаев характеризовались чаще лимфоцитозом, чем лимфопенией (73,3% и 26,7% соответственно;  $p < 0,001$ ). Диагностическая значимость лимфоцитоза при ИК представлена в таблице 68.

Таблица 68 – Операционные характеристики лимфоцитов при ИК (%)

Диагностические характеристики	Результаты
Чувствительность	59%
Специфичность	57%
Прогноз положительного результата	64%
Прогноз отрицательного результата	52%
Точность метода	58%

Чувствительность составила 59%, прогноз положительного результата подтверждал вероятность ИК в 64% случаев при наличии лимфоцитоза. Изучение отклонений нейтрофилов при терапевтических заболеваниях показало, что лимфоцитоз характерен при ИК у больных с заболеваниями органов кровообращения чаще, чем регистрировали в случаях отсутствия ИК (42,7% и 6,6% соответственно;  $p < 0,001$ ). Реже отмечали лимфоцитоз у больных при патологии в полости рта и лихорадке (22,7% и 16,0% соответственно) (Таблица 69).



Таблица 69 – Отклонения лимфоцитов у больных ИК с терапевтическими заболеваниями

Заболевания систем организма	Группа ИК (+) (n=179)		Группа ИК(-) (n=140)		P
	Отклонения (n=75)		Отклонения (n=61)		
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Кровообращения	32 (42,7)	32,1-53,9	4 (6,6)	2,6-15,7	< 0,001
Пластическая хирургия	3 (4,0)	1,4-11,1	3 (5,0)	1,7-13,5	1,0*
Кожи и подкожной клетчатки	4 (5,3)	2,1-12,9	7 (11,5)	5,7-21,8	0,19
Костно-мышечной	2 (2,7)	0,7-9,2	1 (1,6)	0,3-8,7	1,0*
ЖКТ	5 (6,7)	2,9-14,7	0 (0,0)	0,0-5,9	0,064*
Мочеполовая	0 (0,0)	0,0-4,9	1 (1,6)	0,3-8,7	0,45*
Полости рта	17 (22,7)	14,7-33,3	25 (41,0)	29,5-53,5	0,021
Лихорадка	12 (16,0)	9,4-25,9	20 (32,8)	22,3-45,3	0,022

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$

Анализ лимфоцитоза у больных при кардиологических заболеваниях выявил, что среди заболеваний органов кровообращения лимфоцитоз чаще отмечали при ИЭ (34,4%), миокардите (25,0%), врожденных пороках сердца (18,8%) и реже – при ревматизме (15,6%) и ИБС (6,3%).

Показатели лимфоцитов при этиологически различных видах ИК представлены в таблице 70.

Таблица 70 – Лимфоцитоз у больных при различных ИК

Отклонения	Мономикробная ИК (n=123)			P
	Бактериальная (n=121)		Грибковая (n=2)	
	Грамположительная (n=105)	Грамотрицательная (n=16)	Грибы (n=2)	
Абс.	46	5	2	0,76 <sup>^</sup>
% или доля	43,8	31,3	2/2	
95% ДИ	34,7-53,4	14,2-55,6		
Отклонения	ИК (n=179)			P
	Мономикробная (n=123)	Полимикробная (n=56)		
	абс.	53	22	
%	43,1	39,3		0,63
95% ДИ	34,7-51,9	27,6-52,4		

Примечание: при  $n \leq 10$  относительный показатель представлен простой дробью, в числителе которой приведено абс. значение, а в знаменателе – объем группы; <sup>^</sup> – при сравнении грам (+) и грам (-)

Из таблицы 70 видно, что лимфоцитоз немного чаще отмечали при грамположительной, чем при грамотрицательной ИК (43,8% и 31,3% соответственно). Грибковая ИК характеризовалась лимфоцитозом. Лимфоцитоз

чаще сопровождал мономикробную, чем полимикробную ИК (43,1% и 39,3% соответственно).

Таким образом, отклонения показателей лимфоцитов в 41,9% случаев характеризовались лимфоцитозом (73,3%), при котором вероятность ИК составляла 64%. Лимфоцитоз при ИК отмечали у больных с заболеваниями органов кровообращения, полости рта и лихорадке. Среди кардиологических заболеваний лимфоцитоз сопровождал ИК при ИЭ, миокардите, ВПС. Лимфоцитоз характерен для грамположительной, мономикробной ИК.

### **Скорость оседания эритроцитов**

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) применяется для диагностики инфекций и заболеваний, протекающих с воспалительными процессами. СОЭ оценивается по высоте образовавшегося слоя плазмы (мм) за 1 час [178]. Поверхность эритроцита имеет отрицательный заряд из-за сиаловых кислот, входящих в состав клеточных мембран. Эритроциты оседают медленно при нормальных показателях СОЭ, так как одинаковые отрицательные заряды создают отталкивание между эритроцитами. При патологических процессах на поверхности эритроцита скапливаются молекулы белка, заряд меняется, эритроциты склеиваются, быстро спускаются в виде столбика, показатель СОЭ увеличивается. Появление белков острой фазы воспаления ведёт к повышению СОЭ [259]. При острых инфекционных процессах изменение СОЭ отмечается через 24 часа. Растворённые в крови белки различно меняют показатель СОЭ. Альбумины затрудняют оседанию эритроцитов, глобулин и фибриноген ускоряют СОЭ. Повышение СОЭ не является специфическим признаком воспаления, однако указывает на наличие в организме патологического процесса. Нормальное значение СОЭ не означает отсутствие заболевания, повышенные цифры СОЭ выявляют при острых воспалениях [178, 230].

Полученные данные в работе показатели СОЭ сравнивали с референтными показателями. Отклонения показателей СОЭ при ИК составляли 40,8% случаев и характеризовались повышением (100,0%), тем самым подтвердили наличие воспалительного процесса. Диагностическая значимость отклонений показателей

СОЭ при ИК представлена в таблице 71.

Таблица 71 – Диагностические характеристики СОЭ (%)

Диагностические характеристики	Результаты
Чувствительность	45,0%
Специфичность	48,0%
Прогноз положительного результата	52,0%
Прогноз отрицательного результата	40,0%
Точность метода	46,0%

Из таблицы 71 видно, что чувствительность составила 45%, прогноз положительного результата показал вероятность ИК в 52,0% случаев при повышенных уровнях СОЭ. Нами изучены отклонения показателей СОЭ у больных при терапевтической патологии (Таблица 72). Из таблицы 72 видно, что повышение показателей СОЭ при заболеваниях органов кровообращения чаще случалось при ИК, чем без инфекции в крови (58,9% и 20,0% соответственно;  $p < 0,001$ ), реже – при патологии в полости рта (13,7%) и лихорадке (12,3%). При изучении показателей СОЭ у больных при ИК и отдельных кардиологических заболеваниях оказалось, что при ИК повышенные значения СОЭ чаще возникали у больных при ИЭ (34,9%), ревматизме (20,9%), врожденных пороках сердца (18,6%), миокардите (16,3%) и реже – при ИБС (9,3%).

Таблица 72 – Отклонения уровней СОЭ у больных ИК при терапевтических заболеваниях

Заболевания систем организма	Группа ИК (+) (n=179)		Группа ИК (-) (n=140)		p
	Отклонения (n=73)		Отклонения (n=65)		
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Кровообращения	43 (58,9)	47,4-69,5	13 (20,0)	12,1-31,3	< 0,001
Пластическая хирургия	4 (5,5)	2,2-13,3	4 (6,1)	2,4-14,8	1,0*
Кожи и подкожной клетчатки	4 (5,5)	2,2-13,3	6 (9,2)	4,3-18,7	0,52*
Мочеполовой	0 (0,0)	0,0-5,0	1 (1,5)	0,3-8,2	1,0*
Полости рта	10 (13,7)	7,6-23,4	21 (32,3)	22,2-44,4	0,0089
Лихорадка	9 (12,3)	6,6-21,8	20 (30,7)	20,9-42,8	0,0080
ЖКТ	3 (4,1)	1,4-11,4	0 (0,0)	0,0-5,6	0,28*

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$

Интерес представляло изучить отклонения показателей СОЭ у больных при разных по этиологии ИК (Таблица 73).

Таблица 73 – Отклонения показателей СОЭ при различных ИК

Отклонения	Мономикробная ИК (n=123)			p
	Бактериальная (n=121)		Грибковая (n=2)	
	Грамположительная (n=105)	Грамотрицательная (n=16)	Грибы (n=2)	
Абс.	40	7	1	0,66 <sup>^</sup>
% / доля	38,1	43,7	1/2	
95% ДИ	29,4-47,6	23,1-66,8		
Отклонения	ИК (n=179)			
	Мономикробная (n=123)	Полимикробная (n=56)		
абс.	48	25		0,48
%	39,0	44,6		
95% ДИ	30,9-47,9	32,4-57,6		

Примечание: при  $n \leq 10$  относительный показатель представлен простой дробью, в числителе которой приведено абс. значение, а в знаменателе – объем группы; <sup>^</sup> – при сравнении грам (+) и грам (-)

Установлено, что отклонения показателей СОЭ при грамотрицательной ИК случались чаще, чем при грамположительной (43,7% и 38,1% соответственно). Отмечались повышенные показатели СОЭ при грибковой ИК. Наблюдались чаще повышенные показатели СОЭ при полимикробной ИК по отношению к мономикробной (44,6% и 39,0% соответственно).

Таким образом, измененные показатели СОЭ при ИК составили 40,8% случаев и характеризовались повышением. Вероятность ИК составила 52% при повышенных уровнях СОЭ. Чаще показатели СОЭ при ИК повышались у больных с заболеваниями органов кровообращения, полости рта и при лихорадке. Среди кардиологических заболеваний ИК повышала показатели СОЭ при ИЭ, ревматизме, ВПС, миокардите.

## 6.2. Маркеры из числа сывороточных белков

На воспалительный агент запускается местный ответ или системная реакция организма. Воспалительная реакция организма связана с появлением реактантов воспаления в виде белков разнообразной природы, которые являются лабораторными маркерами воспаления. При отрицательном посеве крови определяют косвенные показатели воспаления [25, 101]. Повышенный уровень С-реактивного белка (СРБ) (63,6 мг/л) при грамотрицательном сепсисе и ИЭ взаимосвязан с активностью токсико-инфекционных проявлений (лихорадка, лейкоцитоз, нейтрофилез, повышение СОЭ) [25, 42]. Рост уровня СРБ на фоне лечения соответствует осложненному течению, низкой эффективности

антибактериальной терапии, определяет неблагоприятный прогноз [101]. Фибриноген является также маркером острой фазы воспаления, наличия инфекционного заболевания. Концентрация фибриногена увеличивается в несколько раз и долго держится в крови. Повышение концентрации фибриногена рассматривается как фактор риска тромбоза и развития сердечно-сосудистых заболеваний. При остром процессе воспаления увеличиваются значения  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов, при хроническом – повышаются уровни  $\gamma$ -глобулинов и снижаются уровни альбуминов.

### **С-реактивный белок**

СРБ относят в первую очередь к индикаторам воспаления [42, 80, 215]. Показатели СРБ определяются для мониторинга системных воспалений, при тяжёлых заболеваниях, сепсисе, травмах, для косвенной диагностики бактериальной и вирусной инфекции. Высокие уровни СРБ выявляют при бактериальной и низкие – при вирусной инфекциях. Пациенты с высоким уровнем СРБ имеют больший риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, включая гипертоническую болезнь, инфаркт миокарда, инсульт.

Для диагностической оценки СРБ при ИК исследовали 112 проб крови больных: 88 с ИК и 19 без ИК. Использовали параметры нормы и сравнивали с референтными показателями в крестах (+) по Меньшикову В. В. (1987 г.). Обнаружено, что показатели СРБ при ИК составили 30,7% случаев. Для оценки диагностической ценности наличия СРБ при ИК определили аналитические характеристики (Таблица 74).

Таблица 74 – Операционные характеристики СРБ при ИК (%)

Диагностические характеристики	Результаты
Чувствительность	31,6%
Специфичность	50,0%
Точность	36,8%
ППР (+)	61,5%
ППР (-)	22,3%

Из таблицы 74 видно, что чувствительность теста составляла 31,6%. Прогноз положительного результата предполагал наличие ИК в 61,5% случаев при

появлении СРБ у больных в крови. Выявление СРБ у больных с терапевтическими заболеваниями представлено в таблице 75.

Таблица 75 – СРБ у пациентов ИК при терапевтических заболеваниях

Заболевания систем организма	Группа ИК (+) (n=88)		Группа ИК (-) (n=24)		p
	Отклонения (n=27)		Отклонения (n=14)		
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Кровообращения	19 (70,4)	51,5-84,1	11 (78,6)	52,4-92,4	0,72*
Кожи и подкожной клетчатки	2 (7,4)	2,1-23,4	0 (0,0)	0,0-21,5	0,54*
Полости рта	1 (3,7)	0,7-18,3	0 (0,0)	0,0-21,5	1,0*
Лихорадка	5 (18,5)	8,2-36,7	3 (21,4)	7,6-47,6	0,71*

Из таблицы 75 видно, что среди терапевтических заболеваний при наличии ИК показатели СРБ отмечали у больных при заболеваниях системы кровообращения (70,4%) и лихорадке (18,5%), реже – при заболеваниях кожи и подкожной клетчатки (7,4%), полости рта (3,7%). Среди кардиологических больных с ИК показатели СРБ чаще появлялись при ревматизме (36,8%), в одинаковых долях при ИЭ и миокардите (31,6%). Нами анализирована реакция СРБ у больных при разных по этиологии ИК (Таблица 76).

Таблица 76 – Активность СРБ при различных ИК

Отклонения	Мономикробная ИК (n=59)		p
	Грамположительная (n=46)	Грамотрицательная (n=13)	
Абс.	13	4	1,0*
%	28,3	30,7	
95% ДИ	17,3-42,5	12,7-57,6	
Отклонения	ИК (n=88)		
	Мономикробная (n=59)	Полимикробная (n=29)	
абс.	17	10	0,59
%	28,8	34,5	
95% ДИ	18,8-41,4	19,9-52,7	

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера

Установлено, что появление СРБ чаще происходило при грамотрицательной ИК, чем при грамположительной (30,7% и 28,3% соответственно). СРБ чаще появлялось при полимикробной ИК, чем мономикробной (34,5% и 28,8% соответственно).

Таким образом, СРБ у больных вырабатывался в ответ на ИК в 30,7% случаев

при терапевтической патологии. Прогноз положительного результата предполагал ИК в 61,5% случаев. СРБ активно реагировал на ИК при заболеваниях органов кровообращения и лихорадке, среди кардиологических заболеваний – при ревматизме, ИЭ, миокардите. СРБ чаще повышался при грамотрицательной и полимикробной ИК.

### **Фибриноген**

Фибриноген является маркером воспаления и некроза тканей. Повышаются уровни фибриногена при сепсисе, гнойных инфекциях, воспалении. С увеличением уровня фибриногена увеличиваются показатели СОЭ. Гиперфибриногемия является фактором риска развития синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдрома). Пониженный уровень фибриногена, дефибринация, встречается при различных инфекциях.

Для оценки роли фибриногена при ИК исследовали 112 проб крови терапевтических больных: 88 больных с эпизодами ИК и 19 больных без ИК. Использованы параметры нормы для фибриногена 2,0–4,0 г/л

и полученные данные сопоставляли с ними. Отклонения уровней фибриногена при ИК были в 44,3% случаев и характеризовались повышенными значениями (97,4%). Диагностическая значимость отклонений показателей фибриногена представлена в таблице 77.

Таблица 77 – Операционные характеристики фибриногена при ИК (%)

Диагностические характеристики	Фибриноген
Чувствительность	40,8%
Специфичность	53,3%
Точность	44,3%
ППР (+)	68,9%
ППР (-)	26,2%

Показано, что чувствительность теста составила 40,8%, прогностическая ценность положительного результата предполагала наличие ИК в 68,9% случаев при гиперфибриногемии. При изучении повышенных показателей фибриногена при терапевтической патологии оказалось, что уровни фибриногена повышались при ИК у больных заболеваниями органов кровообращения (92,3%) и реже с заболеваниями кожи и подкожной клетчатки (5,1%) (Таблица 78).

Таблица 78 – Отклонения уровней фибриногена у больных при терапевтических заболеваниях

Заболевания систем организма	Группа ИК (+) (n=88)		Группа ИК (-) (n=24)		p
	Отклонения (n=39)		Отклонения (n=12)		
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Кровообращения	36 (92,3)	79,7-97,3	10 (83,3)	55,2-95,3	0,58*
Кожи и подкожной клетчатки	2 (5,1)	1,4-16,9	0 (0,0)	0,0-24,2	1,0*
Лихорадка	1 (2,6)	0,5-13,2	2 (16,7)	4,7-44,8	0,13*

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера

При изучении частоты отклонений показателей фибриногена при ИК у кардиологических больных показано, что повышались уровни фибриногена при ИК у больных ИЭ (38,9%), ревматизмом (27,8%), миокардитом (22,2%) и реже в равных долях при ВПС и ИБС (5,6%).

Активность фибриногена при различных по этиологии ИК показана в таблице 79.

Таблица 79 – Отклонения фибриногена при различных ИК

Отклонения	Мономикробная ИК (n=59)		p
	Бактериальная		
	Грамположительная (n=46)	Грамотрицательная (n=13)	
Абс.	21	4	0,52*
%	45,7	30,8	
95% ДИ	32,2-59,8	12,7-57,6	
Отклонения	ИК (n=88)		p
	Мономикробная (n=59)	Полимикробная (n=29)	
	абс.	25	
%	42,4	48,3	
95% ДИ	33,0-58,5	31,4-65,6	

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера; в остальных случаях – значимость критерия  $\chi^2$

Из таблицы 79 видно, что повышение уровней фибриногена случалось чаще при грамположительной, чем при грамотрицательной ИК (45,7% и 30,8% соответственно). Отклонения уровней фибриногена не отличались при мономикробной и полимикробной ИК (42,4% и 48,3% соответственно;  $p = 0,80$ ).

Таким образом, отклонения уровней фибриногена у больных при ИК составили 44,3% случаев и характеризовались повышением (97,4%). Повышенные уровни фибриногена у больных показали вероятность наличия ИК в 68,9% случаев. Среди



терапевтических больных с ИК чаще повышался фибриноген у больных при заболеваниях органов кровообращения, включая ИЭ, ревматизм, миокардит. Фибриноген чаще повышался при грамположительной и полимикробной ИК.

### Общий белок

Белки считаются важными составляющими организма и поддерживают коллоидно-осмотическое давление, обеспечивая постоянный объем крови. Они связывают воду и задерживают ее в кровяном русле, в тканевой жидкости белков меньше. Общий белок в сыворотке крови – это концентрация альбумина и глобулинов в сумме, выраженная в г/литр, является лабораторным показателем, отражающим состояние гомеостаза, диагностическим параметром при целом ряде заболеваний. Увеличение общего белка в крови (гиперпротеинемия) связано с усиленным синтезом белков острой фазы воспаления и наблюдается при острых и хронических инфекциях. Снижение концентрации общего белка в крови (гипопротеинемия) связано с гипоальбуминемией при длительной субфебрильной лихорадке и хроническом воспалительном процессе.

Нами проведена оценка показателей общего белка при ИК на основе исследования 97 проб крови от 78 больных ИК и 19 больных с отрицательным посевом крови. За норму были взяты концентрации общего белка в сыворотке крови 65 – 85 г/л и полученные данные сопоставляли с данными показателями. Отклонения количества общего белка у больных при ИК отмечали в 26,9% случаев и характеризовались гипопротеинемией (90,5%). Показано, что чувствительность теста составила 27,0%, прогноз положительного результата показал вероятность ИК в 76,9% случаев при гипопротеинемии в крови (Таблице 80).

Таблица 80 – Операционные характеристики отклонений показателя общего белка у больных при ИК (%)

Диагностические характеристики	Результаты
Чувствительность	27,0%
Специфичность	66,7%
Точность	34,8%
ППР (+)	76,9%
ППР (-)	18,2%

При исследовании снижения общего белка у больных при терапевтических

заболеваниях оказалось, что при эпизодах ИК количество общего белка снижалось у больных с заболеваниями органов кровообращения (85,7%) и реже при лихорадочном состоянии (14,3%) (Таблица 81).

Таблица 81 – Отклонения общего количества белка у больных ИК при терапевтических заболеваниях

Заболевания систем организма	Группа ИК (+) (n=78)		Группа ИК (-) (n=19)		p
	Отклонения (n=21)		Отклонения (n=6)		
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Кровообращения	18 (85,7)	67,7-94,5	6 (100,0)	61,0-100,0	1,0*
Лихорадка	3 (14,3)	5,5-32,3	0 (0,0)	0,0-39,0	

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера

Мы проанализировали снижение общего белка при ИК у кардиологических больных и показали, что при эпизодах ИК наблюдали гипопроотеинемию в крови в равных долях при ИЭ и ревматизме (33,3%), реже – при ИБС (16,7%), миокардите (11,1%), ВПС (5,6%).

Анализ снижения общего белка у больных при различных по этиологии ИК показал, что гипопроотеинемия чаще развивалась при грамотрицательной, чем при грамположительной у больных ИК (27,3% и 20,9% соответственно). Гипопроотеинемия в крови у больных при ИК чаще происходила при полимикробной, чем мономикробной ИК (37,5% и 22,2% соответственно) (Таблица 82).

Таблица 82 – Снижение общего белка крови у больных при различных ИК

Отклонения	Мономикробная ИК (n=54)		p
	Грамположительная (n= 43)	Грамотрицательная (n= 11)	
Абс.	9	3	0,71*
%	20,9	27,3	
95% ДИ	11,4-35,2	8,9-53,2	
Отклонения	ИК (n=78)		p
	Мономикробная (n=54)	Полимикробная (n=24)	
абс.	12	9	0,16
%	22,2	37,5	
95% ДИ	13,2-34,9	21,2-57,3	

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера

Таким образом, отклонение количества общего белка крови при ИК

наблюдали в 26,9% случаев и характеризовались снижением (90,5%). Прогноз положительного результата показал вероятность наличия ИК в 76,9% случаев при гипопроотеинемии у больных. Снижение белка у больных наблюдали при заболеваниях органов кровообращения и лихорадке. У кардиологических больных снижался общий белок при ИЭ, ревматизме, ИБС, миокардите. Гипопроотеинемия чаще наблюдали при грамотрицательной и полимикробной ИК.

### **Альбумин-глобулиновый коэффициент**

Альбумин-глобулиновый коэффициент (АГК) – это величина, выражающая отношение количества альбуминов к количеству глобулинов в крови. При острых инфекциях и хроническом воспалении снижение АГК обусловлено уменьшением концентрации альбуминов и увеличением глобулинов. При хронических инфекциях снижение концентрации альбуминов связано с переходом альбуминов в ткани вследствие повышения проницаемости стенок сосудов, превращения в глобулины. Повышение АГК случается при гипотиреозе.

Изучено состояние АГК при ИК на 97 пробах крови от 78 больных с подтвержденной ИК и от 19 больных без ИК. За норму были взяты показатели АГК в сыворотке крови 1,3–2,0 и полученные данные сопоставляли с данными показателями. Отклонения АГК у больных с ИК определяли в 88,5% случаев и характеризовались снижением коэффициента (100%). Анализ диагностических характеристик АГК при ИК представлен в таблице 83.

Таблица 83 – Операционные характеристики альбумин-глобулинового коэффициента при ИК (%)

Диагностические характеристики	Результат
Чувствительность	100,0%
Специфичность	0,0%
Точность	80,4%
ППР (+)	91,4%
ППР (-)	0,0%

Из таблицы 83 видно, что чувствительность данного теста высокая (100,0%), но тест не является специфичным (0,0%). Прогноз положительного результата показал вероятность ИК в 91,4% случаев при снижении уровня АГК. При изучении отклонения АГК у больных при терапевтических заболеваниях показано, что у терапевтических больных при эпизодах ИК снижение показателей АГК отмечено

при заболеваниях системы кровообращения (94,2%), реже – при лихорадке (5,8%), поэтому более подробно изучили отклонения АГК при сердечно-сосудистых заболеваниях (Таблица 84).

Таблица 84 – Отклонения альбумин-глобулинового коэффициента при терапевтических заболеваниях

Заболевания систем организма	Группа ИК (+) (n=78)		Группа ИК (-) (n=19)		p
	Отклонения (n=69)		Отклонения (n=18)		
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Кровообращения	65 (94,2)	86,0-97,7	17 (94,4)	74,2-99,0	1,0*
Кожа и подкожная клетчатка	0 (0,0)	0,0-5,3	1 (5,6)	1,0-25,8	0,21*
Лихорадка	4 (5,8)	2,3-14,0	0 (0,0)	0,0-17,6	0,58*

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера

У кардиологических больных снижение значений АГК чаще отмечали при ИЭ (32,3%), миокардите (27,7%), ревматизме (21,5%), ИБС (12,3%), реже – при ВПС (6,2%).

Анализ изменений показателей АГК у больных при различных ИК представлен в таблице 85.

Таблица 85 – Снижение альбумин-глобулинового коэффициента при различных ИК

Отклонения	Мономикробная ИК (n=54)		p
	Грамположительная (n= 43)	Грамотрицательная (n= 11)	
Абс.	40	10	1,0*
%	93,0	90,9	
95% ДИ	81,4-97,6	62,3-98,4	
Отклонения	ИК (n=78)		p
	Мономикробная (n=54)	Полимикробная (n=24)	
абс.	50	19	0,12*
%	92,6	79,2	
95% ДИ	82,4-97,1	59,5-90,8	

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера

Из таблицы 85 видно, что снижение показателей АГК происходило в равных долях при грамположительной и грамотрицательной ИК (93,0% и 90,9% соответственно; p = 1,0). Показатели АГК снижались при мономикробной чаще, чем при полимикробной ИК (92,6% и 79,2% соответственно).

Таким образом, отклонения показателей АГК при ИК наблюдали в 88,5% случаев в сторону снижения. Прогноз положительного результата показал

вероятность ИК в 91,4% случаев на фоне снижения АГК. Показатели АГК снижались при заболеваниях системы кровообращения, включая ИЭ, миокардит, ревматизм, ИБС. Снижение показателя АГК наблюдали чаще при грамположительной мономикробной ИК.

### **$\alpha_2$ -глобулин**

Цинксодержащий белок  $\alpha_2$ -глобулин включает углеводный компонент и белки острой фазы, контролирует развитие инфекции, формирует иммунологические реакции. Увеличение  $\alpha_2$ -глобулинов наблюдается при остром воспалении с выраженным экссудативным и гнойным характером. Снижение  $\alpha_2$ -глобулинов наблюдается при сахарном диабете, токсических гепатитах, ревматическом полиартрите, ДВС [2].

Мы оценили показатели  $\alpha_2$ -глобулинов при ИК на модели 97 проб крови у 78 больных с подтвержденной ИК и у 19 больных с отрицательным посевом крови. За норму были взяты концентрации  $\alpha_2$ -глобулинов в сыворотке крови 7–13% и полученные данные сопоставляли с данными показателями. Отклонения уровней  $\alpha_2$ -глобулинов при ИК отмечали в 11,5% случаев в сторону повышения показателей (88,9%). Анализ диагностической ценности повышенных значений  $\alpha_2$ -глобулинов при ИК представлен таблице 86.

Таблица 86 – Операционные характеристики отклонений  $\alpha_2$ -глобулинов при ИК (%)

Диагностические характеристики	Результаты
Чувствительность	23,0%
Специфичность	61,1%
Точность	30,4%
ППР (+)	70,8%
ППР (-)	16,1%

Из таблицы 86 видно, что чувствительность составила 23,0%, специфичность – 61,1%. Прогноз положительного результата предполагал вероятность ИК в 70,8% случаев при повышенных значениях  $\alpha_2$ -глобулинов. При изучении повышенных показателей  $\alpha_2$ -глобулинов у больных при терапевтических заболеваниях установлено, что отклонения  $\alpha_2$ -глобулинов в 66,7% случаев выявлены у больных заболеваниями системы кровообращения и в 33,3% случаев – при лихорадке (Таблица 87).

Таблица 87 – Отклонения  $\alpha_2$ -глобулинов у пациентов ИК при терапевтических заболеваниях

Заболевания систем организма	Группа ИК (+) (n=78)		Группа ИК (-) (n=19)		p
	Отклонения (n=9)		Отклонения (n=6)		
	n	доля	n	доля	
Кровообращения	6	6/9	6	6/6	0,23*
Лихорадка	3	3/9	0	0/6	

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера

При изучении отклонений  $\alpha_2$ -глобулинов у кардиологических больных выявлены повышенные показатели  $\alpha_2$ -глобулинов при ИК у больных ИЭ (50,0%), ИБС (33,3%), ревматизмом (16,7%).

Анализ отклонений  $\alpha_2$ -глобулинов при разных по этиологии ИК представлен в таблице 88.

Таблица 88 – Повышение  $\alpha_2$ -глобулинов у больных при различных ИК

Отклонения	Мономикробная ИК (n=54)		p
	Грамположительная (n= 43)	Грамотрицательная (n= 11)	
Абс.	6	2	0,66*
%	14,0	18,2	
95% ДИ	6,6-27,3	5,1-47,7	
Отклонения	ИК (n=78)		
	Мономикробная (n=54)	Полимикробная (n=24)	
абс.	8	1	0,26*
%	14,8	4,2	
95% ДИ	7,7-26,6	0,7-20,2	

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера

Установлено, что уровни  $\alpha_2$ -глобулинов у больных чаще повышались при грамотрицательной, чем при грамположительной ИК (18,2% и 14,0% соответственно). Чаще повышались значения  $\alpha_2$ -глобулинов при мономикробной, чем при полимикробной ИК (14,8% и 4,2% соответственно).

Таким образом, отклонения уровней  $\alpha_2$ -глобулинов при ИК отмечено в 11,5% случаев в сторону повышения (88,9%). Вероятность ИК при повышенных уровнях  $\alpha_2$ -глобулинов составила 70,8% случаев. Повышение уровней  $\alpha_2$ -глобулинов отмечено при заболеваниях органов кровообращения, включая ИЭ, ревматизм, ИБС. Чаще повышались уровни  $\alpha_2$ -глобулинов при грамотрицательной мономикробной ИК.

## γ-глобулин

Фракция γ -глобулинов вместе с альбуминами и фибриногеном составляют белковую часть плазмы крови. Этот белок начинает вырабатываться, когда в организм попадает чужеродный микроорганизм. Повышение содержания γ-глобулинов (гипергаммаглобулинемия) наблюдается при инфекционных заболеваниях, при наличии антител, при уменьшении фракции альбуминов общий объем белков в плазме остается неизменным [22, 69]. Уменьшение γ-глобулинов (гипогаммаглобулинемия) отмечается при состояниях, связанных с истощением, угнетением иммунной системы, при продолжительных инфекционных процессах, нарушении синтеза иммуноглобулинов, терапии цитостатическими препаратами.

Мы проанализировали показатели γ-глобулинов при ИК на 97 пробах крови от 78 больных с подтвержденной ИК и 19 больных с отрицательным посевом крови. За норму были взяты концентрации γ-глобулина в сыворотке крови 12–22% и полученные данные сопоставляли с представленными показателями. Отклонения количества γ-глобулинов у больных ИК наблюдали в 25,6% случаев и характеризовались повышенными уровнями показателей (85,0%). Анализ диагностических характеристик повышенных показателей γ-глобулина показал, что чувствительность теста составила 14,9%, специфичность – 77,8%. Прогноз положительного результата показал вероятность наличия ИК в 78,2% при повышенных цифрах γ-глобулина (Таблица 89).

Таблица 89 – Операционные характеристики повышенного количества γ-глобулина при ИК (%)

Результаты	Диагностические характеристики				
	Чувствительность	Специфичность	Точность	ППР (+)	ППР (-)
	14,9%	77,8%	27,2%	78,2%	18,2%

Отклонения количества γ-глобулина у больных при терапевтических заболеваниях представлены в таблице 90. Из таблицы 90 видно, что параметры γ-глобулина повышались у больных при заболеваниях органов кровообращения (95,0%) и реже – при лихорадке (5,0%), поэтому изучили отклонения показателей γ-глобулина при ИК у кардиологических больных. Установлено, что повышенные

показатели  $\gamma$ -глобулина чаще наблюдали при ИЭ (36,8%), миокардите (26,3%), ревматизме (21,1%), ИБС (10,5%) и реже – при ВПС (5,3%).

Таблица 90 – Отклонения  $\gamma$ -глобулина у пациентов с терапевтическими заболеваниями при ИК

Заболевания систем организма	Группа ИК (+) (n=78)		Группа ИК (-) (n=19)		p
	Отклонения (n=20)		Отклонения (n=7)		
	n (%)	95% ДИ	n (%)	95% ДИ	
Кровообращения	19 (95,0)	76,4-99,1	6 (85,7)	48,7-97,4	0,46*
Лихорадка	1 (5,0)	0,9-23,6	0 (0,0)	0,0-35,4	1,0*
Кожа и подкожная клетчатка	0 (0,0)	0,0-16,1	1 (14,3)	2,6-51,3	0,26*

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера

Изменения  $\gamma$ -глобулинов при разных по этиологии ИК представлены в таблице 91.

Таблица 91 – Показатели  $\gamma$ -глобулина крови у больных при различных ИК

Отклонения	Мономикробная ИК (n=54)		p
	Грамположительная (n= 43)	Грамотрицательная (n= 11)	
Абс.	9	2	1,0*
%	20,9	18,2	
95% ДИ	11,4-35,2	5,1-47,7	
Отклонения	ИК (n=78)		p
	Мономикробная (n=54)	Полимикробная (n=24)	
абс.	11	9	0,11
%	20,4	37,5	
95% ДИ	11,8-32,9	21,2-57,3	

Примечание: \* – значимость точного критерия Фишера

Показано, что количество  $\gamma$ -глобулина чаще повышалось при грамположительной, чем при грамотрицательной ИК (20,9% и 18,2% соответственно). Повышение количества  $\gamma$ -глобулина в крови при полимикробной ИК случалось в 1,8 раза чаще, чем при мономикробной (37,5% и 29,4% соответственно).

Таким образом, отклонения показателей  $\gamma$ -глобулина у больных ИК регистрировали в 25,6% случаев в сторону повышения (85,0%). Вероятность наличия ИК при повышенных показателях  $\gamma$ -глобулина составила 78,2% случаев. Уровни  $\gamma$ -глобулина повышались у больных с заболеваниями органов кровообращения, включая ИЭ, миокардит, ревматизм, ИБС. Повышенные показатели  $\gamma$ -глобулина чаще сопровождали грамположительную и



полимикробную ИК.

### 6.3. Диагностическое значение гематологических показателей крови

Для оценки клинической и диагностической значимости гематологических показателей крови при ИК мы объединили полученные результаты по измененным гематологическим показателям (Таблица 92). Из таблицы 92 видно, что гематологические показатели реагировали на циркулирующие у больных в крови микроорганизмы при терапевтической патологии и была отмечена высокая вероятность ИК при измененных уровнях клеток крови (52,0%–72,0%).

Таблица 92 – Измененные гематологические показатели крови у больных при ИК и разных терапевтических заболеваниях (%)

Маркер (отклонений)	Отклонения при ИК и терапевтических заболеваниях (%)						
	органов кровооб- ращения	кожи и подкожной клетчатки	полости рта	лихорад- ка	пластичес- кая хирургия	мономик- робная ИК	полимик- робная ИК
Эритроциты >/< (16,8)	44,7	3,3	30,0	13,4	6,7	16,3	17,9
Гемоглобин < (28,5)	54,9	2,0	13,7	17,6	5,9	26,8	32,1
Лейкоциты > (72,0)	65,5	6,9	6,9	10,3	0,0	18,7	10,7
Нейтрофилы > (30,2)	55,6	7,4	20,4	5,6	1,9	30,9	28,6
Лимфоциты > (41,9)	42,7	5,3	22,7	16,0	4,0	43,1	39,3
СОЭ > (40,8)	58,9	5,5	13,7	12,3	5,5	39,0	44,6

При ИК большинство гематологических показателей имели частые отклонения: лимфоциты (41,9%), СОЭ (40,8%), нейтрофилы (30,2%), гемоглобин (28,5%). Характер отклонений характеризовался повышением лимфоцитов, СОЭ, нейтрофилов (73,3%, 100,0% и 77,8% соответственно) и снижением гемоглобина (92,2%). При грамположительной ИК наблюдали чаще лимфоцитоз (43,8%), нейтрофилез (33,3%), эритроцитоз и эритропению (17,1%). При грамотрицательной – лейкоцитоз (56,3%), повышение СОЭ (43,7%) и гемоглобинпению (31,3%). При мономикробной ИК – лимфоцитоз (43,1%), нейтрофилез (30,9%), лейкоцитоз (18,7%). При полимикробной – повышение СОЭ (44,6%), снижение гемоглобина (32,1%), количественное изменение эритроцитов (17,9%). Суммируя, можно предположить, что лимфоциты и нейтрофилы являются

маркерами грамположительной мономикробной ИК, лейкоциты – маркерами грамотрицательной мономикробной ИК, СОЭ и гемоглобин – маркерами грамотрицательной полимикробной ИК.

#### 6.4. Диагностическое значение сывороточных белков крови

Для оценки клинико-диагностической роли белков острой фазы при ИК у терапевтических больных все полученные результаты суммировали в таблице 93. Из таблицы 93 видно, что белки крови у больных реагировали на циркулирующие в крови микроорганизмы при терапевтической патологии и показали высокую вероятность ИК при измененных уровнях белков в крови (61,5%–91,4%). При ИК у больных большинство белковых показателей крови имели отклонения: фибриноген (44,3%), СРБ (30,7%),  $\gamma$ -глобулин (25,6%),  $\alpha_2$ -глобулин (11,5%), которые характеризовались повышением показателей (97,4%, 100,0%, 88,9% и 85,0% соответственно).

Таблица 93 – Измененные белковые показатели крови у больных ИК и терапевтических заболеваниях (%)

Маркер (отклонений)	Отклонения при кардиологических заболеваниях (%)							
	ИЭ	ревма- тизм	мио- кардит	ВПС	ИБС	лихо- радка	моно- микробная ИК	поли- микробная ИК
СРБ > (30,7)	31,6	36,8	31,6	0,0	0,0		28,8	34,5
Фибриноген > (44,3)	38,9	27,8	22,2	5,6	5,6	2,6	42,4	48,3
Общий белок < (26,9)	33,3	33,3	11,1	5,6	16,7	14,3	22,2	37,5
А/Г коэффициент < (88,5)	32,3	21,5	27,7	6,2	12,3	5,8	92,6	79,2
$\alpha_2$ -глобулин > (11,5)	50,0	16,7	0,0	0,0	33,3	33,3	14,8	4,2
$\gamma$ -глобулин > (25,6)	36,8	21,1	26,3	5,3	10,5	5,0	20,4	37,5

Отклонения количества общего белка (26,9%) и А/Г коэффициента (88,5%) характеризовались снижением показателей (90,5% и 100,0% соответственно). При грамположительной ИК наблюдали количественное повышение фибриногена (45,7%) и  $\gamma$ -глобулина (20,9%) на фоне снижения А/Г коэффициента (93,0%). При грамотрицательной ИК – повышение СРБ (30,7%) и  $\alpha_2$ -глобулина (18,2%) на фоне снижения количества общего белка (27,3%). При мономикробной ИК отмечали

повышение уровня  $\alpha_2$ -глобулина (14,8%) и соответствующее снижение А/Г коэффициента (92,6%). При полимикробной – на фоне повышения СРБ (34,5%), фибриногена (48,3%),  $\gamma$ -глобулина (37,5%) происходило снижение количества общего белка (37,5%).

Среди биохимических показателей крови повышенные значения фибриногена и  $\gamma$ -глобулина являются маркерами грамположительной полимикробной ИК. Появление СРБ и снижение количества общего белка характерно для грамотрицательной полимикробной ИК. Маркером грамположительной мономикробной ИК является снижение показателей А/Г коэффициента, а для грамотрицательной мономикробной ИК характерно повышение уровней  $\alpha_2$ -глобулина.

## **Резюме**

Гематологические показатели у больных при ИК проявили себя в роли маркеров при заболеваниях органов кровообращения в виде лейкоцитоза, повышенного СОЭ и снижения гемоглобина. При воспалении в полости рта выявляли лимфоцитоз, нейтрофилез, количественное изменение эритроцитов. При заболеваниях кожи и подкожной клетчатки отмечали лейкоцитоз, нейтрофилез, повышенное СОЭ. Осложнения после пластической хирургии характеризовались повышенным СОЭ, снижением гемоглобина, количественным изменением эритроцитов. При лихорадке отмечали лимфоцитоз, количественное изменение эритроцитов, снижение гемоглобина. Наиболее активными гематологическими маркерами ИК при терапевтических заболеваниях оказались: эритроциты, гемоглобин и СОЭ, при кардиологических заболеваниях – лейкоциты, нейтрофилы, гемоглобин и СОЭ.

Биохимические маркеры ИК при заболеваниях органов кровообращения проявлялись в виде повышения фибриногена и  $\gamma$ -глобулина (92,3% и 95,0% соответственно), и снижения А/Г коэффициента (94,2%). При ИЭ повышаются СРБ, фибриноген,  $\alpha_2$ -глобулин,  $\gamma$ -глобулин на фоне снижения А/Г коэффициента и количества общего белка. При ревматизме повышается СРБ, фибриноген на фоне снижения количества общего белка. При миокардите повышается СРБ,  $\gamma$ -глобулин

на фоне снижения А/Г коэффициента. При ВПС снижается А/Г коэффициент. При ИБС повышается  $\alpha_2$ -глобулин и снижаются А/Г коэффициент и количество общего белка. При лихорадочном состоянии – повышение  $\alpha_2$ -глобулина (33,3%) на фоне снижения количества общего белка (14,3%). Наиболее активными маркерами ИК у больных при кардиологических заболеваниях являются А/Г коэффициент и СРБ.

## ГЛАВА 7. ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ АЛГОРИТМЫ И СИСТЕМА ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ КРОВотоКА

На основании применения принципов микробиологической культуромики разработаны интегральные алгоритмы диагностики инфекции кровотока, включенные в систему микробиологического исследования крови (Рисунок 36).

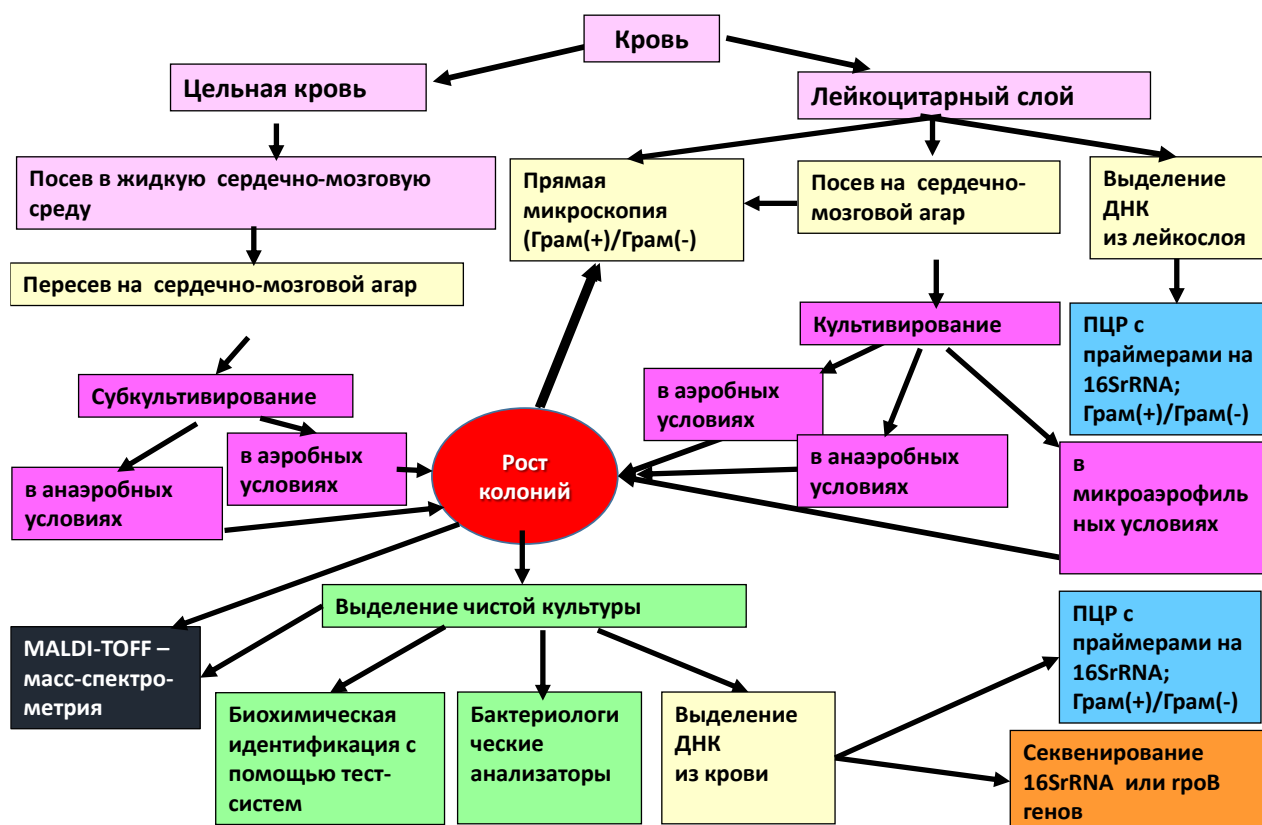


Рисунок 36 – Алгоритм микробиологической диагностики ИК

Алгоритмы системы предлагают использовать один из вариантов взятия и культивирования крови: традиционный посев цельной крови во флакон с питательной средой или экспресс-посев лейкоцитарного слоя на питательный агар. Система микробиологического исследования крови рекомендует соблюдать разработанные принципы гемокультивирования:

1. посев цельной крови в питательную среду в соотношении объема крови к объему питательной среды как 1:10–1:20;
2. использование закрытой анаэробной системы в виде флакона с жидкой высокопитательной средой, с резиновой пробкой, завальцованным металлическим

колпачком и наполненным инертным газом;

3. посев лейкоцитарного слоя пробы крови на чашки Петри с высокопитательным агаром и гемолизированной кровью методом «рассева»;

4. культивирование флаконов с инокулированной цельной кровью в анаэробных условиях;

5. культивирование посевов лейкоцитарного слоя пробы крови в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях параллельно;

6. для получения лейкоцитарного слоя использовать стерильно приготовленные центрифужные пробирки с цитратом натрия или одноразовые стерильные 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 ПЦР-диагностики;

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

Таким образом, рекомендуемые интегральные диагностические алгоритмы микробиологического исследования крови включает альтернативные методы

микробиологического исследования крови, которые реально применять в лабораториях федерального, регионального, территориального уровней, не имеющих современных технических дорогостоящих геманализаторов для получения гемокультуры.

Разработанная универсальная система диагностики инфекции кровотока представляет собой интегральный подход к микробиологическому исследованию крови, как самому трудоемкому и важному при жизнеугрожающих заболеваниях и включает преаналитический, аналитический и постаналитический этапы в исследовании. Система микробиологической диагностики инфекции кровотока предусматривает единую работу клинициста с микробиологом, поэтому на начальном этапе проводить сбор симптоматических маркеров инфекции в крови, анализ количества проб крови, технику взятия крови и вид гемокультуривирования, микроскопию лейкоцитарного слоя пробы крови, как скрининг-анализ циркулирующих в крови микроорганизмов для выбора эмпирической терапии. Аналитический этап заключается в классическом или экспрессном вариантах гемокультуривирования, определении гематологических и биохимических маркеров инфекции кровотока, применение молекулярно-генетических методов для определения и идентификации возбудителей в крови. Заключительный этап исследования предусматривает интегральную оценку всех полученных данных для оценки клинической значимости выделенного микроорганизма или ассоциаций возбудителей и подбор целенаправленной антимикробной терапии.

Таким образом, система диагностики инфекции кровотока состоит из бактериологических, микроскопических, молекулярно-генетических, масс-спектрометрических методов и выявления маркеров инфекции кровотока (симптоматические, гематологические, биохимические).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные тенденции инфекционного процесса включают спектр терапевтических заболеваний с участием микроорганизмов у госпитальных и внегоспитальных больных [120].

Главная проблема ИК в мире – это высокая летальность (до 48%) среди больных любого профиля, включая терапевтических [54, 114]. В Европе и Северной Америке регистрируется до 250000 летальных исходов при ИК ежегодно [271]. К факторам риска летальности у терапевтических больных отнесли: гипертонию, катетеры, высокий креатинин, цирроз печени, онкогематологические заболевания, опухоли, гемодиализ, возраст 65 лет и старше, коморбидные заболевания, сердечную недостаточность [40, 221]. Описаны случаи летальности от 15% до 63% случаев при отдаленных ИК у больных спустя от 30 дней до 4 лет после первого эпизода ИК [213]. ИК у гемодиализных пациентов возникала в 13,7% случаев, включая *S.aureus* (54,0%) [157]. В России проблема ИК рассматривается в рамках онкологических и онкогематологических заболеваний, при которых уровень летальности составляет до 57% случаев [9, 98, 104]. Уровень КАИК в нашей стране связывают с оказанием медицинской помощи, в 2013 году проблема составляла 1,7 и в 2014 году – 35,6 на 1000 катетеризированных пациентов [1, 50]. Назначение несоответствующей терапии приводило к осложнению в виде ИК с летальностью в 21% случаев. Описана пневмония с ИК у пожилых амбулаторных пациентов на фоне алкоголизма, недостаточности питания, диабета, хронической почечной недостаточности с летальностью в 22,2% случаев. ИК диагностировали в 12,3% случаев после назотрахеальной интубации. Среди терапевтических заболеваний, осложненных ИК, лидируют онкогематологические [104]. К числу коморбидных инфекций, провоцирующих ИК, отнесли остеомиелит, артрит, инфекцию кожи и мягких тканей, пневмонию [48].

Поэтому, стояла важная задача – оптимизировать диагностику инфекции в кровотоке на основе разработанной системы и определенных принципов гемокультивирования. С этой целью изучили приемы культуромики, которые



использовали для изучения полного состава микробиоты кала. Благодаря применению разнообразных принципов культуромики были описаны 2776 новых видов микроорганизмов, среди которых обнаружен *Mycobacterium saopaulense*, возбудитель туберкулеза и лепры [128]. В 2015–2017 гг. выделено и идентифицировано 300 новых видов микроорганизмов при разных заболеваниях [202].

Для выполнения поставленной задачи и применения принципов микробиологической культуромики мы подбирали оптимальные условия для повышения эффективности получения гемокультуры и диагностики ИК.

В России посев крови проводится согласно Приказу № 585 от 1985 года [89] и средний показатель получения гемокультур по публикациям составляет 20,0% случаев. Импортные ручные и автоматизированные гемокультуральные системы в некоторых микробиологических лабораториях федерального уровня показали диагностическую эффективность получения гемокультуры в 13,4% случаев [4, 9, 32, 51, 84, 98, 106]. Результаты получения гемокультур у больных с онкогематологией в разных клиниках, выполненных по приказу №535 и на Bact/Alert, отличались незначительно (10,4% и 15,8% соответственно) [109]. Невысокая эффективность в диагностике ИК подтверждает необходимость разработки системы диагностики ИК.

Мы в своей работе получали гемокультуру классическим методом с использованием флаконов для инокуляции цельной крови у госпитальных больных в 38,3% случаев и у внегоспитальных пациентов – в 48,0% случаев, применяя для этих пациентов метод прямого посева лейкоцитарного слоя на высокопитательный гемагар. Известно, что в крови циркулирует небольшое количество микроорганизмов, соответственно единичные клетки попадут в 10 мл посевной дозы. Мы применили метод прямого посева крови на агар, где посевным материалом служил лейкоцитарный слой, представляющий собой концентрат из микроорганизмов, находящихся в данной пробе крови.

Мы объясняем разницу в получении диагностических результатов ИК благодаря применению нами принципов культуромики: закрытая анаэробная

система, соотношение объема крови к объему питательной среды 1:20, СМС для культивирования и субкультивирования, применение экспресс-метода посева крови.

Анаэробные газовые условия культивирования и субкультивирования создают оптимальные возможности для метаболизма микроорганизмов в искусственных условиях пребывания. По этому поводу в мировой литературе противоречивые рекомендации. Имеются предложения заменить анаэробный флакон с питательной средой для крови на дополнительный аэробный или оставить анаэробный флакон при подозрении наличия анаэробов в крови, что увеличит положительные находки на 6%. Эти предложения противоречат созданию оптимальных условий для жизнедеятельности микроорганизмов в искусственных условиях пребывания. В Приказе №535 [89] кровь инокулируют во флаконы с ватно-марлевой пробкой, создавая изначально только аэробные условия культивирования. Мы учитывали, что анаэробное культивирование является основополагающим условием для выделения микроорганизмов из крови и этот постулат подтвердили полученные результаты выделения микроорганизмов из крови. Из всего количества нами выделенных штаммов (816) аэробные (695) составляли 85,2%, но 293 (42,2%) из них выросли только в анаэробных условиях. Нами также было получено 121 штамм строгих анаэробов. Без применения анаэробных условий культивирования диагностическая потеря составляла бы 50,7% случаев. Анаэробные условия являются необходимым продолжением гемокультивирования и для субкультивирования. Большинство аэробных микроорганизмов (32,5%) выросло при субкультивировании в анаэробных условиях и только в 7,3% случаев аэробные возбудители дали рост в аэробных газовых условиях. Для автоматизированного гемокультивирования используют анаэробные закрытые системы, но отсутствует в мировой литературе данные о применении анаэробных газовых условий при субкультивировании, что вероятно снижает результаты выделения возбудителей ИК. Имеются результаты, подтверждающие наши позиции, о пользе анаэробных флаконов, показывающие, что большинство факультативно-анаэробных возбудителей ИК давали рост в

анаэробных условиях (91,6%) [233].

Соотношение объема крови к объему питательной среды многими исследователями рассматривается не одинаково, не придавая важность этому моменту. В целях экономии применяют небольшие объемы среды во флаконах. В наших исследованиях использовали соотношение объема крови к объему питательной среды 1:20. Приказ №535 рекомендует соотношение 1:10 – 1:60 для преодоления бактерицидных признаков крови [89]. На практике в России во флаконах содержится от 30 мл до 84 мл среды для инокуляции 10 мл крови, получается соотношение 1:3 до 1:8. Импортные гемокультуральные системы допускают соотношения 1:3–1:5 при инокуляции 10 мл крови в 30–50 мл среды [233, 289]. Испанские среды («Conda») (50 мл), индийские («Himedia») (70 мл); французские («Bio Merieux») для VacT/ALERT FA Plus (30 мл), VacT/ALERT FN (40 мл) ограничены соотношением кровь: среда, как 1:5, 1:7, 1:2 и 1:4 соответственно. Чем больше объем питательной среды по отношению к 10 мл крови, тем чаще получают положительные гемокультуры, так при 1:10 – 60%, 1:30 – 70% и 1:100 – 75% случаев.

Кроме малого количества микробных тел в посевной дозе крови существует факт циркуляции клинически значимых возбудителей из числа долгорастущих бактерий. Необходимо учитывать смену благоприятных условий жизнедеятельности микроорганизмов в кровяном русле на искусственные питательные среды, что побуждает принимать во внимание особенности гемокультивирования, а именно, термостатирование крови более 7 дней и проводить субкультивирование посевов без видимых признаков роста. В повседневной практике ручное инкубирование гемокультуры длится не более 7 дней, на автоматизированных системах – 5 дней. Пролонгированный инкубационный период предполагает еще субкультивирование при ИЭ. При ручном гемокультивировании микробный рост определяется визуально при просмотре флаконов и при помощи микроскопии материала «кровь-среда». Спустя два-три дня инкубации крови просмотр флаконов становится затрудненным ввиду гемолиза, поэтому спустя 7 дней инкубации проводят контрольное «слепое»

субкультивирование материала с микроскопическим анализом. Большинство микроорганизмов растут спустя 5 дней культивирования, идентификация осуществляется к 7 дню. Многие исследования показали [152, 159, 151, 226, 294, 295], что автоматизированные длительного мониторинга системы определяют рост микроорганизмов раньше (3–5 дней) ручных гемосистем (7 дней). На системах ВАСТЕС 9000, Difco ESP, VacT/Alert микроорганизмы давали рост через два-три дня в 96% и спустя 5–6 дней инкубации гемокультуры были положительными в 99,0% случаев. Клинически значимые микроорганизмы выделяли в течение трех дней, анаэробным агентам требовалось более 5 дней инкубации. При субкультивировании проб визуально отрицательных после 7 дней инкубации рост микроорганизмов в зарубежных источниках отмечали в 0,2% случаев, которые считали контаминантами, поэтому отменяли проверочное субкультивирование. По данным зарубежных исследователей современные автоматизированные гемокультуральные системы способны увеличить скорость роста микроорганизмов до 3–5 дней инкубации и для ручных систем рекомендуют выдерживать посеvy крови до 7 дней [161, 226, 294]. Наши результаты не подтвердили предположения зарубежных исследователей в отношении ограничения времени для культивирования крови и отмены контрольного субкультивирования визуально отрицательных проб, так как авторы не учитывали особенности жизнедеятельности некоторых циркулирующих микроорганизмов в кровотоке. Мы в противоположность этому мнению выдерживали флаконы в термостате более 7 дней и выделяли клинически значимые микроорганизмы. При контрольном высеве 200 флаконов получили рост 239 штаммов микроорганизмов, из которых были аэробные 214 (89,5%), анаэробные 23 (9,6%) и грибы 2 (0,9%).

Известна значимая роль питательной среды в получении гемокультуры. В России панкреатический гидролизат рыбной муки из каспийской кильки является основой питательных сред промышленного отечественного производства [108]. В докладе о номенклатуре и качестве медицинских изделий, находящихся в обращении на отечественном рынке, отметили, что из общего объема медицинских изделий доля отечественных составляет 16,5%, поэтому важной задачей является

разработка и внедрение инновационных подходов с упором на отечественную продукцию. Из медицинских изделий для микробиологии доля отечественной составляет 33%. В Росздравнадзоре зарегистрировано более 200 наименований питательных сред отечественных производителей и более 3000 – иностранных компаний. Для ручного гемокультивирования в нашей стране используются среды: Россия (НИЦФ, г.Оболенск), Испания («Pronadisa»), Индия («HiMedia»), Англия («Oxoid») и для автоматизированного – Франция («Bio-Merieux»), США («Becton Dickinson»). Центральная фабрика готовых сред (ЦФГС) – первое в России импортозамещающее инновационное высокотехнологическое предприятие по промышленному производству качественных готовых микробиологических сред, соответствующих международным стандартам, не выпускает гемокультуральные среды для микробиологического исследования крови. На практике нашли применение разные питательные основы и добавки для сред: сердечно-мозговой экстракт («HiMedia», «Pronadisa»), мясной гидролизат (НИЦФ), тиогликолевый бульон («HiMedia», «Pronadisa»), трипказо-соевая среда («Bio-Merieux»), соево-казеиновая («Becton Dickinson»), триптонно-соевый бульон («Oxoid»). Для гемокультивирования в России нет отечественной сердечно-мозговой среды с ростовыми добавками. Большинство практических лабораторий используют двухфазную среду лабораторного изготовления с ватно-марлевой пробкой и бумажным колпачком согласно Приказу № 535 [89]. Мы сконструировали СМС (жидкую и агаровую) с использованием: сердечных и мозговых экстрактов, приготовленных лабораторным путем из свежих мозгов и сердец крупного рогатого скота. Опытным путем на 260 пробах крови больных сравнили результаты получения роста микроорганизмов на ТГС и жидкой СМС. Аэробные микроорганизмы давали рост в 2,4 раза чаще на СМС, чем на ТГС, анаэробные выросли в 6,2% случаев – на СМС и не давали роста на ТГС. Мономикробные гемокультуры в 2,3 раза и полимикробные – в 4,3 раза чаще получали на СМС, чем на ТГС. В зарубежной и отечественной литературе отсутствуют данные об использовании анаэробного гемагара для субкультивирования, в нашей работе применяли свежеприготовленный сердечно-мозговой агар с гемолизированной

кровью. Исследование на 300 пробах материала «кровь-среда» было показано преимущество СМА в 2,2 раза по отношению к 5% кровяному МПА для роста аэробных микроорганизмов в аэробных и анаэробных условиях.

В мировой практике всегда приветствуются экспрессные технологии. Опубликованы отечественные варианты ускоренных способов получения гемокультуры. При фракционном посеве крови положительные результаты получали в 31,5%–41,9% случаев. Описаны методы индикации микроорганизмов в пробе крови или в положительной гемокультуре современными молекулярно-генетическими методами (ПЦР с секвенированием, мультиплексная ПЦР, флюоресцентная гибридизация) и идентификация методом масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS) [7, 24, 52, 68, 87]. Мы применили экспресс-метод посева лейкоцитарного слоя пробы крови с получением культуры возбудителя через 24 часа и диагностировали ИК в 48,0% случаев. Преаналитический этап данного метода имел много преимуществ, поэтому применили этот метод для внегоспитальных пациентов: взятие малого количества крови (4,5 мл), закрытая система промышленного производства в виде шприца для взятия крови, закрытая пробирка удобна для пациента для транспортировки в течение 4-х часов в лабораторию.

Микроскопия мазка биоматериала актуальна, как простой метод экспресс-диагностики любой инфекции. Мы применили это общепринятое условие в микробиологии. Идентификация обнаруженных микроорганизмов осуществляется на основании морфологических и тинкториальных признаков микроба. В Приказе № 535 [89] рекомендуется делать мазок крови в виде «толстой капли». В мировой литературе имеется много сообщений о диагностической роли микроскопического исследования крови с упором на выявление тех микроорганизмов, которые не растут в гемокультуре и публикуется различные методы приготовления мазков крови. Нами была применена под наши отечественные технические условия методика приготовления мазка крови из лейкоцитарного слоя пробы крови. Данная техника приготовления мазка является общепринятой в мировой практике, но в России не применяется. Для взятия крови использовали промышленного выпуска

«шприц-пробирку» с цитратом натрия. Оптимальная затрата времени в 15–30 минут на просмотр одного стекла с использованием масляной иммерсии ( $\times 1000$ ) позволяет просмотреть много полей зрения для обнаружения микроорганизмов в мазке. При затрате более 10 минут ИК диагностируется в 36% случаев. Некоторые отечественные авторы не обнаружили микроорганизмы при микроскопии лейкоцитарного слоя, другие исследователи выявляли микроорганизмы в «тонком мазке» в 52,2% случаев. Мы придали статус экспресс-метода диагностики ИК методу микроскопии мазка лейкоцитарного слоя, так как обнаружили микроорганизмы в 75,4% случаев, включая бактерии (31,0%), грибы (2,1%) и бактериально-грибковые ассоциации (66,9%). В случае отрицательной гемокультуры микроорганизмы были выявлены в мазках крови в 61,3% случаев и назначена эмпирическая антимикробная терапия в соответствии с морфологическими и тинкториальными признаками найденных микроорганизмов. Необходимо отметить тот факт, что при микроскопии были обнаружены адгезированные кокки на эритроцитах, что связано с высокой антигемоглобиновой активностью штаммов *S.epidermidis* (57,6%) и анемией. Экзометаболиты грибов *p.Candida* усиливают антигемоглобиновую активность *S.epidermidis* в 2 раза [110]. Также были обнаружены мицелиальные формы грибов *p.Candida*, которые тоже обладают активной адгезивностью и растут в анаэробных условиях существования. Нити псевдомицелия были обнаружены до 40% случаев. Обнаружение стафилококк–грибковых ассоциаций имеет важное диагностическое значение для стратегии лечения. Стафилококк имеет специальные рецепторы для связывания с гифами гриба. Пептидогликан играет роль в образовании гифов грибов *p.Candida*, которые выполняют функцию транспорта для диссеминации стафилококка по организму больного. Симбиоз стафилококка с грибами *p.Candida* считается угрожающей ассоциацией [138]. Полученные опубликованные результаты микроскопии и посева крови (30,4% и 17,4% соответственно) подтвердили диагностическую и экспрессную ценность метода микроскопии по отношению к бактериологическому [185, 313] и сравнили их с результатами нашей работы (75,4% и 41,3% соответственно). В отечественной литературе по

инвазивному кандидозу отсутствуют методы экспрессной микробиологической диагностики К, включая микроскопию крови [80].

Клинико-лабораторная диагностика ИК первоначально опирается на наличие симптомокомплекса у больных. Повышенная температура тела относится к ведущему признаку наличия микроорганизмов в кровотоке. Однако, мы определили особенность, что при ИК лидирует озноб (88,8%). Нами было также замечена гендерная особенность при ИК. Мужчины чаще женщин страдают ГИК (72,5%). Клинико-биохимические показатели крови широко используются для оценки тяжести и прогноза заболеваний. Нам не удалось найти в литературных источниках комплексное исследование гематологических и биохимических показателей крови в роли маркеров при ИК, поэтому нами были изучены гематологические и биохимические показатели крови и их маркерная роль у больных при ИК. Среди изученных гематологических и биохимических маркеров ИК отмечали наличие эритропении (47,5% и 5,0% соответственно) и снижение уровня гемоглобина (83,1% и 9,5% соответственно) при грамположительной чаще, чем при грамотрицательной ИК. Наличие анемии объясняется антигемоглобиновой активностью стафилококков, которые этиологически преобладали и циркулировали в крови при симбиозе с грибами *p.Candida* (67%), что способствовало повышению этой активности. Нейтрофилез и лимфопения (53,5%), белковые показатели крови доказали инфекционный характер воспаления.

Молекулярно-генетические методы широко вошли в медицину, включая микробиологию. Они имеют много преимуществ. Метод ПЦР применяют при диагностике любой инфекции. Нами был апробирован метод постановки ПЦР с лейкоцитарного слоя. В мировой литературе опубликованы единичные исследования по диагностике Б методом 16S rRNA ПЦР для индикации микроорганизмов в крови [354]. Нам был оптимизирован данный метод для идентификации обнаруженных микроорганизмов. Сравнительный анализ результатов в ПЦР лейкоцитарного слоя с результатами микроскопического исследования лейкоцитарного слоя показал совпадение в 100% случаев.

В рамках выполненной диссертационной работы доказано наличие ИК у



41,3% терапевтических больных и лабораторно подтверждена получением 31% положительных гемокультур. Этиология грамположительной ИК терапевтических больных характеризуется факультативно-анаэробными (83,6%), облигатно анаэробными (14,8%) бактериями и грибами (1,6%). Среди факультативно-анаэробов доминируют грамположительные кокки (70,4%). При использовании классического метода посева крови получили гемокультуру в 27,4% случаев, посев лейкоцитарного слоя обеспечил 42,8% положительных результатов. Дополнительное диагностическое значение в 75,4% случаев придал микроскопический метод исследования лейкоцитарного слоя, включая положительные находки микроорганизмов в мазках в 61,3% случаев при отрицательной гемокультуре. Наибольшее число микроскопических находок составляли ассоциации грамположительных кокков с грибами (66,9%). Обнаружение грибов микроскопически и невозможность их получения в гемокультуре заслуживает пристального внимания и внедрения микроскопического метода диагностики ИК в практическую работу.

Представленная работа показала реальные возможности получения гемокультуры при соблюдении условий микробиологической культуромики и выполнения диагностики ИК как системы микробиологического исследования крови. В работе изучили диагностическую и прогностическую роль маркеров воспаления при ИК у терапевтических больных, новые технологические экспресс-методы обнаружения микроорганизмов в крови и выделения их из крови. Разработанная система диагностики ИК, представленная в виде алгоритмов, практически применима в лабораториях федерального и регионального уровней в стране.

## 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 стафилококков, из которых *S.epidermidis* составил 74,0%.

4. Принимая во внимание сложный генез многих терапевтических заболеваний, сопровождающихся инфекцией кровотока, рационально использовать интегральный диагностический принцип изучения и оценки результатов широкого спектра клинико-лабораторных методов. По нашим данным это маркеры воспаления из числа симптоматических, гематологических и биохимических показателей, которые также являются ценными прогностическими признаками инфекции кровотока.

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

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

альбумин-глобулинового коэффициента.

6. Разработанная на принципах современной культуромикрии 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 культуromики и систему микробиологического исследования крови, для повышения диагностической эффективности при гемокультивировании.

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

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

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

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

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

государственную программу замещения импортных дорогостоящих сред.

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

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

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

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

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

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

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

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

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

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

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АГК	– альбумин-глобулиновый коэффициент
Б	– бактериемия
БИТ	– блок интенсивной терапии
ВГИ	– внегоспитальная инфекция
ВГИК	– внегоспитальная инфекция кровотока
ВИК	– вторичная инфекция кровотока
ВПС	– врожденные пороки сердца
ВОЗ	– Всемирная Организация Здравоохранения
ГИ	– госпитальная инфекция
ГИК	– госпитальная инфекция кровотока
ГКПМ-Оболенск	– Государственная коллекция патогенных микроорганизмов клеточных культур-Оболенск
ДВС	– синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания
ДКМП	– дилатационная кардиомиопатия
ИБС	– ишемическая болезнь сердца
ИВ	– индекс встречаемости
ИК	– инфекция кровотока
ИСМП	– инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
ИЭ	– инфекционный эндокардит
К	– кандидемия
КАИК	– катетер-ассоциированная инфекция кровотока
КИ	– коморбидные инфекции
КНС	– коагулазонегативные стафилококки
ЛНГ	– лихорадка неясного генеза
ЛНП	– лихорадка неясного происхождения
ЛПО	– лечебно-профилактическая организация
МПА	– мясо-пептонный агар
МСП-1	– микроскоп световое поле-1

НП	– неоптерин
ОМПИК	– инфекция кровотока, связанная с оказанием медицинской помощи
ПКТ	– прокальцитонин
ПСП	– пресепсин
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
СИБ-тесты	– системы индикаторные бумажные-тесты
СКС	– среда для контроля стерильности
СМА	– сердечно-мозговой агар
СМС	– сердечно-мозговая среда
СОЭ	– скорость оседания эритроцитов
СПб ГБУЗ	– Санкт-Петербургское государственное учреждение здравоохранения
СРБ	– С-реактивный белок
ССЗ	– сердечно-сосудистые заболевания
ТГС	– тиогликолевая среда
УПМ	– условно-патогенные микроорганизмы
Ф	– фунгемия
ФГБОУ ВО	– Федеральное государственное бюджетное
СЗГМУ МЗ РФ	образовательное учреждение высшего образования Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова Министерства Здравоохранения Российской Федерации
ФБУН ГНЦПМБ	
Роспотребнадзора	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



ФБУН ЦНИИЭ – Роспотребнадзора	Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
ФГБОУ ВО ПСПбГМУ МЗ РФ	– Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И.П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации
ФГАОУ ВО РНИМУ МЗ РФ	– Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
CDC	– The Centers for Disease Control and Prevention, Центры по контролю и профилактике заболеваний
CLSI	– The Clinical and Laboratory Standards Institute, Институт клинических и лабораторных стандартов
Eh	– окислительно-восстановительный потенциал
Hr	– гаптоглобин
MALDI-ToF-MS	– Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, Время пролетная масс спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией
NAD	– никотинамидаденин
NT-pro-BNP	– натрийуретический пептид
SPS	– полианетолсульфат натрия

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абдулгасанов, Р.А. Инфекция сосудистых протезов / Р.А. Абдулгасанов // Проблемы здоровья и экологии. – 2016. – № 29. – С. 12–17.
2. Акимкин, В.Г. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Информационный бюллетень за 2018 г. / В.Г. Акимкин, А.В. Тутельян, О.А. Орлова, А.А. Голубкова, О.А. Квасова, Н.В. Сычева, Т.С. Скачкова. – М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2019. – 51 с.
3. Анализ данных лучевых методов исследования на основе принципов доказательной медицины: учебное пособие / А.Ю. Васильев, А.Ю. Малый, Н.С. Серов. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 22 с.
4. Арефьева, Л.И. Послеоперационные бактериемии у пациентов кардиохирургического профиля / Л.И. Арефьева, Е.М. Горская, О.А. Савостьянова, Т.С. Спирина, Л.Ю. Ромашкина, Н.И. Габриэлян // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2015. – Т. 20, № 5. – С. 19–23.
5. Аснер, Т.В. Современные аспекты урогенных реактивных артритов (эпидемиология, патогенез, клиника) / Т.В. Аснер, А.Н. Калягин // Сибирский медицинский журнал. – 2010. – № 1. – С. 133–136.
6. Асфандиярова, Н.С. Гендерная и возрастная структура множественных хронических заболеваний пациентов Рязанской области / Н.С. Асфандиярова, О.В. Дашкевич, Е.В. Заикина, Е.И. Сучкова, Н.В. Хотееенкова, А.Н. Якубенко, И.А. Прокудина, Т.С. Волхонцева, Е.А. Печенкина, Е.В. Красильникова, О.А. Маркина, М.Н. Алексеева // Клиницист. – 2017. – Т. 11, № 3–4. – С. 65–72.
7. Афанасьев, М.В. MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ для идентификации возбудителей чумы, холеры и туляремии / М.В. Афанасьев, Л.В. Миронова, С.В. Балахонов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2015. – № 2. – С. 3–8.
8. Ахтямов, И.Ф. Динамика сывороточных реактантов острой фазы воспаления при интрамедуллярном остеосинтезе в эксперименте / И.Ф. Ахтямов, Ф.В. Шакирова, Л.Д. Зубаирова, Э.Б. Гатина, Э.И. Алиев // Казанский медицинский журнал. – 2014. – Т. 95, № 3. – С. 395–398.

9. Багирова, Н.С. Таксономическая структура и резистентность к антибиотикам возбудителей инфекций кровотока у онкогематологических больных / Н.С. Багирова // Клиническая онкогематология. – 2015. – Т. 8, № 2. – С. 191–200.

10. Багирова, Н.С. Бактериemia истинная или ложная: значение критериев оценки клинической значимости положительной гемокультуры / Н.С. Багирова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – Т. 60, № 8. – С. 55–61.

11. Беганская, А.В. Роль современных маркеров системного воспаления в диагностике и прогнозировании течения инфекционного эндокардита / А.В. Беганская, А.П. Ройтман, А.Г. Морозов, А.В. Бугров, Т.А. Федорова, В.В. Долгов // Лабораторная служба. – 2017. – Т. 6, № 2. – С. 7–14.

12. Беленков, Ю.Н. Гендерные различия в распространенности и эффективности лечения артериальной гипертензии в Европейской части Российской Федерации: результаты исследования эпоха-2007 / Ю.Н. Беленков, И.В. Фомин, Ю.В. Бадин, Д.С. Поляков, В.Ю. Мареев, Ф.Т. Агеев // Проблемы женского здоровья. – 2011. – Т. 6, № 4. – С. 5–11.

13. Белов, Б.С. Бактериальный (септический) артрит и инфекция протезированного сустава: современные аспекты / Б.С. Белов // Современная ревматология. – 2010. – Т. 4, № 3. – С. 10–17.

14. Белов, Б.С. Проблема коморбидных инфекций у больных ревматоидным артритом / Б.С. Белов // Современная ревматология. – 2014. – № 2. – С. 21–27.

15. Белялов, Ф.И. Проблема коморбидности при заболеваниях внутренних органов / Ф.И. Белялов // Вестник современной клинической медицины. – 2010. – Т. 3, № 2. – С. 44–47.

16. Бережанский, Б.В. Инфекции диализных катетеров / Б.В. Бережанский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 2. – С. 107–117.

17. Бережанский, Б.В. Катетер-ассоциированные инфекции кровотока / Б.В. Бережанский, А.А. Жевнерев // Болезни и возбудители. – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 130–144.

18. Бернштейн, Л.М. Рак гормонозависимых тканей и проблемы коморбидности (сердечно-сосудистые заболевания, инсульт, остеопороз) / Л.М. Бернштейн // Вопросы онкологии. – 2010. – Т. 56, № 4. – С. 384–391.

19. Васильева, Н.В. Диагностика и лечение инвазивных микозов: современные рекомендации / Н.В. Васильева, Н.Н. Клишко, В.А. Цинзерлинг // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова. – 2010. – Т. 2, № 4. – С. 5–18.

20. Ватутин, Н.Т. Лимфопения: основные причины развития / Н.Т. Ватутин, Е.В. Ещенко // Архив внутренней медицины. – 2016. – Т. 2, № 28. – С. 22–27.

21. Вершинина, М.Г. Совершенствование лабораторной диагностики инфекции кровотока для обеспечения эпидемиологической безопасности ЛПУ / М.Г. Вершинина, Е.Ю. Калугина, Н.Б. Кухтина, Н.И. Почкина, И.В. Пак // Вестник Росздравнадзора. – 2017. – № 4. – С. 50–57.

22. Вершинина, М.Г. Оптимизация алгоритма лабораторной диагностики инфекций кровотока / М.Г. Вершинина, Е.Ю. Калугина, Л.П. Майковская, И.В. Пак // Проблемы медицинской микологии. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 50.

23. Внутрелабораторный контроль качества питательных сред для клинических микробиологических исследований: клинические рекомендации / В.В. Меньшиков, Р.С. Козлов, М.С. Поляк, В.С. Михайлова, Л.О. Иноземцева, Б.Ф. Шуляк, О.У. Стецюк, О.И. Кречикова, А.П. Шепелин, С.М. Суханова. – Москва: Федерация лабораторной медицины, 2014. – 42 с.

24. Гаврилов, С.Н. Современные молекулярно-генетические методы, используемые для этиологической диагностики сепсиса / С.Н. Гаврилов, Т.С. Скачкова, О.Ю. Шипулина, Ю.А. Савочкина, Г.А. Шипулин, В.В. Малеев // Журнал микробиологии. – 2016. – № 2. – С. 91–99.

25. Горин, В.С. Прогностическая значимость белков острой фазы воспаления в неотложной гинекологии / В.С. Горин, Т.Г. Кондранина, Н.Г. Потехина // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – № 5. – С. 18–23.

26. ГОСТ Р 53079.4–2008. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила

ведения преаналитического этапа. – М.: Стандартинформ, 2009. – 69 с.

27. ГОСТ Р 57989–2017. Продукция пищевая специализированная. Методы выявления патогенных микроорганизмов на основе полимеразной цепной реакции. – М.: Стандартинформ, 2018. – 24 с.

28. ГОСТ Р ЕН 12322–2010 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик питательных сред. – М.: Стандартинформ, 2011. – 12 с.

29. ГОСТ ISO/TS 11133-1-2014 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству питательных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории. – М.: Стандартинформ, 2015. – 20 с.

30. Грувер, К.П. Клинико-эпидемиологическое значение бактериемии: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.09 / Грувер Клавдия Павловна. – М., 2011. – 27 с.

31. Грувер, К.П. Клиническое значение бактериемии у больных сепсисом / К.П. Грувер, В.Б. Белобородов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т. 13, № 1. – С. 90–97.

32. Грувер, К.П. Клинико-эпидемиологические особенности бактериемии / К.П. Грувер, В.Г. Жуховицкий, В.Б. Белобородов // Инфекционные болезни. – 2010. – Т. 8, № 4. – С. 13–18.

33. Гусаров, В.Г. Изменение этиологической структуры и клинических исходов бактериемий у хирургических больных как результат мониторинга и управления антибиотикорезистентностью в многопрофильном стационаре / В.Г. Гусаров, О.Э. Карпов, М.В. Дементиенко, Е.Е. Нестерова, Н.Н. Лашенкова, М.Н. Замятин // Медицинский вестник Юга России. – 2017. – Т. 8, № 1. – С. 51–59.

34. Дворецкий, Л.И. Инфекционная патология в клинике внутренних болезней / Л.И. Дворецкий, С.В. Яковлев // Терапевтический архив. – 2018. – № 11. – С. 112–119.

35. Диагностика инфекции кровотока (посев крови): методическое пособие

для врачей / Н.С. Багирова, Н.В. Дмитриева. – Москва: РОНЦ им.Н.Н. Блохина МЗ России, 2015. – 58 с.

36. Диденко, Л.В. Бактериemia: основы патогенеза при инфекционных и неинфекционных заболеваниях: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.10 / Диденко Любовь Васильевна. – М., 2001. – 44 с.

37. Дмитриева, Н.В. Нозокомиальные инфекции, вызванные бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, в онкологической клинике / Н.В. Дмитриева, В.В. Агинова, И.Н. Петухова, З.В. Григорьевская, А.И. Дмитриева, Н.С. Багирова, И.В. Терещенко, Е.Н. Хмалалзе // Сибирский онкологический журнал. – 2019. – Т. 18, № 1. – С. 36–42.

38. Дмитриенко, О.А. Структурный полиморфизм стафилококковых хромосомных кассет *mec (SCCmec)* у представителей вида *Staphylococcus epidermidis*, выделенных в стационарах Российской Федерации / О.А. Дмитриенко, С.М. Матвеев, А.С. Анкирская, Л.А. Любасовская, О.В. Ковалишена, И.Ю. Широкова, Д.А. Попов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – Т. 4, № 71. – С. 21–29.

39. Дорофеева, Ю.А. Качество лечения пациентов с фибрилляцией предсердий в зависимости от индекса полиморбидности, предшествовавшее госпитализации по поводу острого коронарного синдрома / Ю.А. Дорофеева, Е.И. Тарловская // Кардиология. – 2018. – Т. 58, № S5. – С. 54–59.

40. Евсевьева, М.Е. Гендерные особенности распространенности некоторых факторов риска у учащихся и лиц трудоспособного возраста: результаты сравнительного исследования / М.Е. Евсевьева, Г.П. Никулина, М.В. Еремин, В.А. Еремин, А.А. Кветковская, С.В. Загора, Ф.С. Семенова, М.В. Ростовцева, А.Ю. Подушинский, З.Н. Найманова, Л.В. Иванова // Проблемы женского здоровья. – 2011. – Т. 6, № 4. – С. 12–16.

41. Елинов, Н.П. *Candida species* и кандидемия. Состояние проблемы (обзор) / Н.П. Елинов // Проблемы медицинской микологии. – 2000. – Т. 3, № 1. – С. 4–13.

42. Зайцев, А.А. Биологические маркеры воспаления при внебольничной пневмонии / А.А. Зайцев, Ю.В. Овчинников, Т.В. Кондратьева // Consilium

Medicum. – 2014. – № 11. – С. 36–41.

43. Зими́на, В.Н. Выявление микобактерий туберкулеза в крови как метод диагностики генерализованного туберкулеза у пациентов с ВИЧ-инфекцией / В.Н. Зими́на, О.Е. Микова, Т.А. Варецкая, Д.А. Оборо́н, А.Г. Земсков, С.Ю. Дегтярева // Журнал Инфектологии. – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 62–66.

44. Зубков, М.Н. Сбор, транспортировка биологического материала и трактовка результатов микробиологических исследований / М.Н. Зубков // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – Т. 6, № 2. – С. 143–154.

45. Инвазивный кандидоз у ВИЧ-инфицированных пациентов: Федеральные клинические рекомендации, утвержденные общим собранием членов НП «НАСКИ» и Профильной комиссией МЗ РФ по эпидемиологии 27-29.09.2017 / И.П. Чарушина, И.В. Фельдблюм, Н.Н. Воробьева, С.Ю. Баландина, М.В. Кузнецова, Т.А. Варецкая. – Москва: Министерство здравоохранения РФ; Национальная ассоциация специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (НП НАСКИ), 2017. – 46 с.

46. Исхакова, Х.И. Модификация метода посева гемокультур от больных гнойно-септическими заболеваниями и тифо-паратифами / Х.И. Исхакова, Х.М. Вахидова, Л.А. Шамсутдинова // Клиническая лабораторная диагностика. – 1996. – № 5. – С. 41–43.

47. Карапац, М.М. Клинико-микробиологическое обоснование алгоритма диагностики сепсиса и бактериемий: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Карапац Максим Михайлович. – Санкт-Петербург, 2002. – 19 с.

48. Карпин, В.А. Инфекционный эндокардит на рубеже веков: обзор / В.А. Карпин, Б.Т. Зульфигарова, Н.В. Кузьмина, И.Ю. Добрынина, Н.В. Нелидова, О.И. Шувалова, А.В. Бурмасова // Вестник новых медицинских технологий. – 2014. – Т. 8, № 1. – DOI: 10.12737/5947.

49. Карпин, В.А. Анализ летальности больных инфекционным эндокардитом в г. Сургуте / В.А. Карпин, Б.Г. Зульфигарова // Вестник Сургутского государственного университета. – 2017. – Т. 3, № 33. – С. 27–29.

50. Квашнина, Д.В. Комплексная клинико-этиологическая и эпидемиологическая характеристика катетер-ассоциированных инфекций кровотока / Д.В. Квашнина, О.В. Ковалишина, Н.А. Белянина // Медицинский альманах. – 2017. – Т. 4, № 49. – С. 41–45.

51. Киселева, Е.Е. Совершенствование лабораторной диагностики бактериемий и сепсиса у онкогематологических больных с использованием технологий амплификации нуклеиновых кислот: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.01.21 / Киселева Екатерина Евгеньевна. – Санкт-Петербург, 2017. – 24 с.

52. Киселева, Е.Е. Алгоритм выявления и видовой идентификации бактерий в крови с использованием ПЦР / Е.Е. Киселева // Вестник гематологии. – 2017. – № 1. – С. 19–24.

53. Клинико-организационный алгоритм ведения больных с внебольничной пневмонией: методические рекомендации / И.В. Лещенко, З.Д. Бобылева, Н.М. Трифанова, В.А. Руднов, А.Л. Левит, В.В. Базарный, С.С. Смирнова, В.М. Рыжкин. – Екатеринбург: ГБОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия, 2012. – 112 с.

54. Козлов, Р.С. Катетер-ассоциированные инфекции кровотока: предупредить или лечить / Р.С. Козлов, А.В. Голуб // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 23–30.

55. Комплексная лабораторная диагностика системных инфекций и сепсиса: С-реактивный белок, прокальцитонин, пресепсин: научный обзор / В.В. Вельков. – Москва: Диакон, 2015. – 117 с.

56. Краева, Л.А. Микробиологическая характеристика клинически значимых бактерий рода *Corynebacterium* / Л.А. Краева // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – № 1. – С. 5–10.

57. Лисовская, С.А. Роль бактериально-грибковых ассоциаций в развитии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи / С.А. Лисовская, Е.В. Халдеева, Н.И. Глушко // Практическая медицина. – 2016. – Т. 5, № 97. – С. 30–33.

58. Литвин, А.А. Использование данных доказательной медицины в клинической практике (сообщение 3 – диагностические исследования) / А.А.



Литвин, А.Л. Калинин, Н.М. Трizza // Проблемы здоровья и экологии. – 2008. – Т. 4, № 18. – С. 12–19.

59. Лопухов, Л.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике / Л.В. Лопухов, М.В. Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т. 2, № 3. – С. 96–106.

60. Лычев, В.Г. Пневмония, связанная с оказанием медицинской помощи, и внебольничная пневмония: сравнительная характеристика, оптимизация лечения / В.Г. Лычев, Е.Б. Клестер // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 7. – С. 111–115.

61. Лягина, И.А. Экспресс-методики в микробиологическом исследовании крови / И.А. Лягина, Т.К. Корнева // Клиническая лабораторная диагностика. – 1995. – № 5. – С. 48–49.

62. Малова, И.О. Сочетание хронического рецидивирующего урогенитального кандидоза и кандидоза кишечника / И.О. Малова, А.Ю. Кузнецова // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – № 5. – С. 27–31.

63. Малхазова, С.М. Новые и возвращающиеся инфекции в России: медико-географический аспект / С.М. Малхазова, В.А. Миронова, П.В. Пестина, Д.С. Орлов // Вестник Московского университета. – 2016. – № 5. – С. 24–32.

64. Малхазова, С.М. Проблема новых и возвращающихся инфекций: задачи медико-географического изучения / С.М. Малхазова, В.А. Миронова // Вестник Воронежского государственного университета. – 2017. – № 1. – С. 21–31.

65. Мальчикова, А.О. Характеристика возбудителей инвазивного кандидоза у больных опухолями системы крови: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.21, 03.02.03 / Мальчикова Анна Олеговна. – М., 2019. – 27 с.

66. Малярчук, А.П. Проблема чесотки в стационарах психиатрического профиля / А.П. Малярчук, Т.В. Соколова, Ю.В. Лопатина, Л.Б. Важбин, Т.М. Шувалова, Е.Д. Нефедова // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2012. – Т. 15, № 6. – С. 52–57.

67. Матвеева, Е.Ю. Инфекционные осложнения катетеризации центральных

вен / Е.Ю. Матвеева, А.В. Власенко, В.Н. Яковлев, В.Г. Алексеев // *Общая реаниматология*. – 2011. – Т. 7, № 5. – С. 67–74.

68. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I-II групп патогенности: методические рекомендации, МР 4.2.0089-14 / Ю.В. Демина, Н.В. Шеенков, В.Е. Куклев, Н.А. Осина, А.В. Осин, И.Н. Шарова, С.А. Портенко, А.Н. Спицын, Д.В. Уткин, Н.С. Червякова, А.С. Абдрашитова, С.А. Щербакова, С.В. Титова, О.С. Чемисова, В.В. Агафонова, С.О. Чайка, И.А. Чайка, О.А. Рыковская, И.А. Молдаван, Н.В. Павлович, М.В. Цимбалистова, С.В. Балахонов, М.В. Чеснокова, М.В. Афанасьев, Л.В. Миронова, С.А. Татарников, Е.Г. Токмакова, Г.В. Вдовиченко, А.С. Остяк, М.Б. Ярыгина, Е.А. Басов, И.А. Дятлов, Е.А. Тюрин, Л.В. Чекан, К.В. Детушев, А.Е. Хомяков, В.А. Антонов, Г.А. Ткаченко, С.С. Савченко, В.В. Алексеева, О.В. Зинченко, И.М. Шпак, М.А. Гришина, Н.В. Вьючнова, О.С. Ульянова, Д.В. Викторов // *Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора*. – 2015. – Т. 2, № 60. – С. 55–70.

69. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний: методические указания МУК 4.2.3115–13, утвержденные Главным государственным санитарным врачом РФ 21.10.2013. – Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. – 41 с.

70. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы контроля бактериологических питательных сред: методические указания МУК 4.2.2316-08, утвержденные Главным государственным санитарным врачом РФ 18.01.2008. – Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 67 с.

71. Мирошниченко, А.П. Информативность гематологических показателей у больных острым гнойным риносинуситом / А.П. Мирошниченко, Е.Н. Степанов // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – Т. 9, № 2. – С. 259–262.

72. Найговзина, Н.Б. Оптимизация системы мер борьбы и профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в Российской Федерации / Н.Б. Найговзина, А.Ю. Попова, Е.Е. Бирюкова, Е.Б. Ежлова, Е.П. Игонина, В.И. Покровский, В.Г. Акимкин, А.В. Тутельян, Н.В. Шестопапов, С.А. Краевой, Н.А. Костенко, Н.И. Брико, Е.Б. Брусина, Л.П. Зуева, И.В. Фельдблюм, В.В. Шкарин, Р.С. Козлов, В.Л. Стасенко, А.А. Голубкова, Г.Т. Сухих, Т.В. Припутневич, Р.Г. Шмаков, В.В. Зубков, А.С. Шкода, В.И. Шумилов, С.Д. Митрохин, О.Н. Ершова, Е.П. Селькова, Т.А. Гренкова, И.В. Иванов, О.Р. Швабский // Оргздрав: новости, мнения, обучение. Вестник ВШОУЗ. – 2018. – Т. 11, № 1. – С. 17–26.

73. Недосека, В.Б. Профилактика последствий транзиторной бактериемии / В.Б. Недосека, А.П. Гончаров // Клиническая стоматология. – 2002. – № 3. – С. 27–28.

74. Нургазизова, А.К. Происхождение, развитие и современная трактовка понятий «коморбидность» и «полиморбидность» / А.К. Нургазизова // Казанский медицинский журнал. – 2014. – Т. 95, № 2. – С. 292–296.

75. Овчинников, Р.С. Эмерджентные грибковые инфекции животных: новые виды возбудителей / Р.С. Овчинников, М.Г. Маноян, А.Н. Панин // VetPharma. – 2014. – № 2. – С. 66–73.

76. Организация преаналитического этапа лабораторных исследований: международные европейские рекомендации по взятию венозной крови / С.Н. Ковалевская. – Самара: Федерация лабораторной медицины, 2018. – 63 с.

77. Основы доказательной медицины: учебное пособие / И.П. Бубнова, Е.К. Бутина, В.А. Выгодин, И.Е. Колтунов, С.К. Кукушкин, Н.П. Кутишенко, Ю.В. Лукина, С.Ю. Марцевич, Р.Г. Оганов, Е.А. Поддубская, С.А. Шалькова. – Москва: Силиция-Полиграф, 2010. – 134 с.

78. Островская, Э.А. Экспресс-метод выделения гемокультур из крови больных / Э.А. Островская // Лабораторное дело. – 1986. – № 12. – С. 744–746.

79. Патент 2265654 С 2 Российская Федерация, МПК С 12 N 1/20, С 12 Q 1/04. Питательная среда для выделения гемокультур / З.З. Султанов, М.М. Меджидов, Э.Д. Степанова, Л.С. Кулакова, В.Г. Горелова, С.К. Абдулганиева;

заявитель и патентообладатель ФГУП «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», МЗ РФ. – № 2003119514/13; заявл. 26.06.2003; опубл. 10.12.2005, Бюл. № 34. – 6 с.

80. Патент 2471865 С 1 Российская Федерация, МПК С 12 N 1/20, (2006.01). Питательная среда для культивирования и выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухая (варианты) / Я.В. Подкопаев, Т.П. Морозова, Л.В. Домотенко, Н.А. Акимова, М.В. Храмов; заявитель и патентообладатель ФБУН Государственный научно-исследовательский центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ) РФ. – № 2011137669/10; заявл. 14.09.2011; опубл. 10.01.2013, Бюл. № 1. – 12 с.

81. Плотник, Л.Л. Клиническое значение бактериемии у пациентов после колопроктологических операций / Л.Л. Плотник, М.П. Злаказов, А.В. Краснопеев // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2015. – Т. 12, № 1. – С. 40–45.

82. Подготовка пациента, правила взятия, хранения и транспортировки биоматериала для лабораторных исследований: методические рекомендации / А.Г. Кочетов, О.В. Лянг, П.П. Огурцов. – Москва: РУДН, 2012. – 41 с.

83. Полибин, Р.В. Сравнительный анализ смертности от инфекционных болезней в Российской Федерации и некоторых странах Европы / Р.В. Полибин, А.Я. Миндлина, А.А. Герасимов, Н.И. Брико // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2017. – Т. 94, № 3. – С. 4–10.

84. Полухина, О.В. Спектр возбудителей бактериемии у пациентов с иммунодефицитными состояниями различного происхождения / О.В. Полухина, Т.Н. Суборова, А.А. Кузин, А.Н. Петров, В.В. Осовских, Д.А. Гранов, В.В. Пилипенко // Инфекция и иммунитет. – 2014. – Т. 4, № 1. – С. 43–48.

85. Пономарева, Е.Ю. Гендерные различия и особенности клинических проявлений инфекционного эндокардита / Е.Ю. Пономарева, А.П. Ребров // Проблемы женского здоровья. – 2011. – Т. 6, № 4. – С. 36–40.

86. Попов, Д.А. Первый опыт применения метода ПЦР в режиме реального времени для диагностики бактериемии в послеоперационном периоде у кардиохирургических больных / Д.А. Попов, Т.Ю. Вострикова // Клиническая

лабораторная диагностика. – 2011. – № 8. – С. 49–52.

87. Попов, Д.А. Ускоренный способ идентификации возбудителей бактериемий с применением метода газовой хромато-масс-спектрометрии / Д.А. Попов, С.Т. Овсеенко, Г.А. Осипов, Т.Ю. Вострикова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 5. – С. 54–58.

88. Преаналитический этап микробиологических исследований: практические рекомендации / Е.В. Алиева, Л.А. Кафтырева. – Москва: Федерация лабораторной медицины, 2017. – 51 с.

89. Приказ Минздрава СССР от 22 апреля 1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».

90. Руф, Р.Р. Роль воспаления в развитии атеросклероза и сердечно-сосудистых событий / Р.Р. Руф // Сибирское медицинское обозрение. – 2015. – № 6. – С. 23–29.

91. Самарцев, В.А. Особенности инфицирования ожоговых ран / В.А. Самарцев, Ю.А. Еньчева, М.В. Кузнецова, Т.И. Карпунина // Новости хирургии. – 2014. – Т. 22, № 2. – С. 199–206.

92. Самсон, А.А. Бактериemia у лиц пожилого возраста / А.А. Самсон // Ars Medica. – 2010. – Т. 2, № 22. – С. 62–67.

93. Свистунов, С.А. Ранняя диагностика инфекционных осложнений у пострадавших с тяжелыми травмами / С.А. Свистунов, А.А. Кузин, Т.Н. Суборова, И.М. Самохвалов, А.А. Рудь, Д.А. Жарков // Журнал Инфектологии. – 2012. – Т. 4, № 2. – С. 20–25.

94. Синопальников, А.И. Внебольничные инфекции дыхательных путей: «правила» диагностики / А.И. Синопальников, В.А. Решетников // Клиницист. – 2007. – № 2. – С. 19–29.

95. Смольянинов, С.В. Гендерные особенности факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний у взрослого населения избыточным весом в сочетании с неалкогольной жировой болезнью печени / С.В. Смольянинов, Т.Ф. Дементьева,

Р.Н. Складов, Т.Т. Мальцев, И.П. Ульянова // Медицинский вестник Министерства внутренних дел. – 2018. – Т. 4, № 95. – С. 36–41.

96. Сторожаков, Г.И. Маркеры воспаления у пациентов, страдающих циррозом печени, с наличием инфекционных осложнений / Г.И. Сторожаков, Н.Н. Мерзликина, Л.Ю. Ильченко, И.Г. Федоров, Н.Н. Теребилина, Л.Ф. Панченко, В.Ю. Баронец // Архив внутренней медицины. – 2013. – Т. 1, № 9. – С. 69–73.

97. Тарловская, Е.И. Проблема полиморбидности – вызов современной медицине / Е.И. Тарловская // Терапия. – 2017. – № 2. – С. 4–14.

98. Татульян, А.А. Анализ выявленных бактериемий у пациентов с онкогематологической патологией в многопрофильном детском стационаре Краснодаре / А.А. Татульян, Е.И. Кондратьева, Е.И. Клещенко, А.В. Трёмбач // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – Т. 3, № 45. – С. 68–73.

99. Техника сбора и транспортировки биоматериалов в микробиологические лаборатории: методические указания МУ 4.2.2039-05, утвержденные Главным государственным санитарным врачом РФ 23.12.2005. – Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. – 126 с.

100. Улумбекова, Г.Э. Здравоохранение России: 2018–2024 гг. Что надо делать? / Г.Э. Улумбекова // Оргздрав. Вестник высшей школы организации и управления здравоохранением. – 2018. – № 1. – С. 9–16.

101. Федорова, Т.А. Маркеры воспаления, их диагностическое и прогностическое значение при инфекционном эндокардите / Т.А. Федорова, Н.А. Семенов, С.Я. Тазина, А.П. Ройтман, Т.В. Ким, Н.И. Стефаненко // Российский медицинский журнал. – 2013. – № 3. – С. 15–18.

102. Хаертынов, Х.С. Показатели активности апоптоза лимфоцитов крови у детей с неонатальным сепсисом / Х.С. Хаертынов, С.В. Бойчук, В.А. Анохин, Б.Р. Рамазанов, П.Д. Дунаев, С.Ф. Хайбуллина, А.А. Ризванов, А.А. Андреева, М.А. Сатрутдинов // Гены и клетки. – 2014. – Т. IX, № 3. – С. 267–271.

103. Чеботарь, И.В. *Acinetobacter*: микробиологические, патогенетические и резистентные свойства / И.В. Чеботарь, А.В. Лазарева, Я.К. Масалов, В.М.

Михайлович, Н.А. Маянский // Вестник РАМН. – 2014. – Т. 69, № 9–10. – С. 39–50.

104. Чеботкевич, В.Н. Клинико-микробиологическая характеристика инфекции кровотока у онкогематологических больных / В.Н. Чеботкевич, С.С. Бессмельцев, Е.Е. Киселева, Н.П. Стижак, Е.И. Кайтанджан, В.В. Бурылев // Онкогематология. – 2016. – Т. 11, № 3. – С. 58–67.

105. Черненкокая, Т.В. Динамика структуры возбудителей бактериемии и сепсиса у реанимационных больных в многопрофильном стационаре скорой помощи / Т.В. Черненкокая, Л.А. Борисова, И.В. Александрова, С.И. Рей, О.В. Никитина, Д.А. Косолапов // Антибиотики и химиотерапия. – 2013. – Т. 5, № 6. – С. 11–16.

106. Честнова, Т.В. Сравнительный анализ микробного пейзажа возбудителей, выделенных из крови лихорадящих больных / Т.В. Честнова, Н.В. Серегина, И.В. Дешко // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. 19, № 2. – С. 63–65.

107. Шепелин, А.П. Разработка технологии производства панкреатического гидролизата рыбной муки и конструирование на его основе бактериологических питательных сред: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.01.06, 03.02.03 / Шепелин Анатолий Прокопьевич. – М., 2013. – 45 с.

108. Шепелин, А.П. Разработка технологии приготовления панкреатического гидролизата рыбной муки – белковой основы бактериологических питательных сред / А.П. Шепелин, И.А. Дятлов, И.И. Марчихина, Е.Н. Миронова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2011. – № 9. – С. 48–49.

109. Щетинкина, Е.Е. Этиология бактериемий и сепсиса у больных гемобластозами / Е.Е. Щетинкина, В.В. Бурылев, Е.И. Кайтанджан, Н.П. Стижак, С.С. Бессмельцев, В.Н. Чеботкевич // Гематология. – 2014. – Т. 15. – С. 511–518.

110. Щуплова, Е.А. Роль микробов-ассоциантов в процессах взаимодействий бактерий с эритроцитами / Е.А. Щуплова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2017. – № 9 (209). – С. 111–114.

111. Adelman, M.W. Secondary bacterial pneumonias and bloodstream infections

in patients hospitalized with COVID-19 / M.W. Adelman, D.R. Bhamidipati, A.C. Hernandez-Romieu, A. Babiker, M.H. Woodworth, C. Robichaux, D.J. Murphy, S.C. Auld, C.S. Kraft, J.T. Jacob // *Ann Am Thorac Soc.* – 2021. – doi: 10.1513/AnnalsATS.202009-1093RL.

112. Agarwal, P. Budding yeast forms on peripheral blood smear: An intriguing finding / P. Agarwal, N. Tejwani, N. Sachdeva, A. Mehta // *Indian J Haematol Blood Transfus.* – 2018. – Vol. 34(2). – P. 377.

113. Alexandre, M. Group A streptococcal bacteremia following streptococcal pharyngitis in an older patient with diabetes: a case report / M. Alexandre, R. Wang'ondou, L.M. Cooney // *Yale J Biology Medicine.* – 2017. – Vol. 90. – P. 337–340.

114. Al-Hasan, M.N. External validation of bloodstream infection mortality risk score in a population-based cohort / M.N. Al-Hasan, Y.J. Juhn, D.W. Bang, H-J. Yang, L.M. Baddour // *Clin Microbiol Infect.* – 2014. – Vol. 20(9). – P. 886-891.

115. Al-Hasan, M.N. Recurrent gram-negative bloodstream infection a 10-years population – based cohort study / M.N. Al-Hasan, J.E. Eckel-Passow, L.M. Baddour // *J Infect.* – 2010. – Vol. 61. – P. 28-33.

116. Al-Hasan, M.N. Epidemiology and outcome of *Klebsiella* species bloodstream infection: a population-based study / M.N. Al-Hasan, B.D. Lahr, J.E. Eckel-Passow, L.M. Baddour // *Mayo Clin Proc.* – 2010. – Vol. 85(2). – P. 139–144.

117. Al-Hatmi, A.M.S. COVID-19 – associated invasive candidiasis / A.M.S. Al-Hatmi, J. Mohsin, A. Al-Huraizi, F. Khamis // *J Infect.* – 2020. – Vol. 82(2). – P. e45-e46.

118. Altindis, M. A multicenter evaluation of blood culture practices, contamination rates, and the distribution of causative bacteria / M. Altindis, M. Koroglu, T. Demiray, T. Dal, M. Ozdemir, A.Z. Sengil, A.R. Atasoy, M. Dogan, A.C. Cicek, G. Ece, S. Kaya, M. Iraz, B.S. Gultepe, H. Temiz, I. Kandemir, S. Aksaray, Y. Cetinkol, I. Sahin, H. Guducuoglu, A. Kilic, E. Kocoglu, B. Gulhan, O. Karabay // *Jundishapur J Microbiol.* – 2016. – Vol. 9(1). – P. 9-14.

119. Amrane, S. Metagenomics, culturomics, and the human gut microbiota / S. Amrane, D. Raoult, J-C. Lagier // *Expert Rev Anti-Infect Therapy.* – 2018. – Vol. 15(5).



– P. 373–375.

120. Anderson, D.J. Bloodstream infections in community hospitals in the 21st century: A multicenter cohort study / D.J. Anderson, R.W. Moehring, R. Sloane, K.E. Schmader, D.J. Weber, V.G.Jr. Fowler, E. Smathers, D.J. Sexton // *Plos One*. – 2014. – Vol. 9(3). – P. e91713.

121. Arvaniti, V. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis / V. Arvaniti, G. D'Amico, G. Fede, P. Manousou, E. Tsochatzis, M. Pleguezuelo, A.K. Burroughs // *Gastroenterology*. – 2019. – Vol. 139(4). – P. 1246–1256.

122. Bacconi, A. Improved sensitivity for molecular detection of bacteria and *Candida* in blood / A. Bacconi, G.S. Richmond, M.A. Baroldi, T.G. Laffler, L.B. Blyn, H.E. Carolan, M.R. Frinder, D.M. Toleno, D. Metzgar, J.R. Gutierrez, C. Massire, M. Rounds, N.J. Kennel, R.E. Rothman, S. Peterson, K.C. Carroll, T. Wakefield, D.J. Ecker, R. Sampath // *J Clin Microbiol*. – 2014. – Vol. 52(9). – P. 3164–3174.

123. Barnett, K. Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: a cross-sectional study / K. Barnett, S.W. Mercer, M. Norbury, G. Watt, S. Wyke, B. Guthrie // *Lancet*. – 2012. – Vol. 380(9836). – P. 37–43.

124. Baron, E.J. A Guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM) / E.J. Baron, J.M. Miller, M.P. Weinstein, S.S. Richter, P.H. Gilligan, R.B.Jr. Thomson, P. Bourbeau, K.C. Carroll, S.C. Kehl, W.N. Dunne, B. Robinson-Dunn, J.D. Schwartzman, K.C. Chapin, J.W. Snyder, B.A. Forbes, R. Patel, J.E. Rosenblatt, B.S. Pritt // *Clin Infect Dis*. – 2013. – Vol. 57(4). – P. e22-121.

125. Bastug, A. Risk factors for mortality in patients with nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia / A. Bastug, G.R. Yilmaz, B. Kayaaslan, E. Akinci, H. Bodur // *Turk J Med Sci*. – 2012. – Vol. 42(Sup. 1). – P. 1222-1229.

126. Bharihoke, N. Centrifuged buffy-coat smear: an alternative to conventional peripheral blood smear for diagnosis of malaria / N. Bharihoke, P. Singh, V. Subhedar, P. Vyas // *J Evidence Based Med Helthcare*. – 2015. – Vol. 2(19). – P. 8488-8490.

127. Bhatt, P.J. Risk factors and outcomes of hospitalized patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) and secondary bloodstream infections: a multicenter case-control study / P.J. Bhatt, S. Shiau, L. Brunetti, Y. Xie, K. Solanki, S. Khalid, S. Mohayya, P.H. Au, C. Pham, P. Uprety, R. Nahass, N. Narayanan // *Clin Infect Dis.* – 2020. – XX(XX). – P. 1-9.

128. Bilen, M. The contribution of culturomics to the repertoire of isolated human bacterial and archaeal species / M. Bilen, J-C. Dufour, J-C. Lagier, F. Cadoret, Z. Daoud, G. Dubourg, D. Raoult // *Microbiome.* – 2018. – Vol.6. – P. 94–105.

129. Binkhamis, K. Effect of the initial specimen diversion technique on blood culture contamination rates / K. Binkhamis, K. Forward // *J Clin Microbiol.* – 2014. – Vol. 52(3). – P. 980–981.

130. Bonazzetti, C. Unexpectedly high frequency of Enterococcal bloodstream infections in coronavirus disease 2019 patients admitted to an Italian ICU: An observational study / C. Bonazzetti, V. Morena, A. Giacomelli, L. Oreni, G. Casalini, L.R. Galimberti, M. Bolis, M. Rimoldi, E. Ballone, R. Colombo, A.L. Ridolfo, S. Antinori // *Critical Care Medicine.* – 2021. – Vol. 49(1). – P. e31-e40.

131. Bono, V. D. Bloodstream infections in internal medicine / V.D. Bono, D.R. Giacobbe // *Virulence.* – 2016. – Vol. 7(3). – P. 353–365.

132. Bouza, E. Report of ESGNI-001 and ESGNI-002 studies. Blood stream infections in Europe / E. Bouza, J. Perez-Molina, P. Munoz // *Clin Microbiol Infect.* – 1999. – Vol. 5. – P. 2S1-2S12.

133. Blennow, O. Pneumonia and bacteremia due to *Kytococcus schroeteri* / O. Blennow, I. Froding, K. Westling, V. Ozenci // *J Clin Microbiol.* – 2011. – Vol. 50(2). – P. 522–524.

134. Brady, M. Attributable mortality of hospital-acquired bloodstream infections in Ireland / M. Brady, A. Oza, R. Cunney, K. Burns // *J Hospital Infect.* – 2017. – Vol. 98(1). – P. 35–41.

135. Brown, K. Bloodstream infections due to *Peptoniphilus spp.*: report of 15 cases / K. Brown, D. Church, T. Lynch, D. Gregson // *Clin Microbiol Infect.* – 2014. – Vol. 20(11). – P. O857-60.

136. Buetti, N. Incidence of bloodstream infections: a nationwide surveillance of acute care hospitals in Switzerland 2008-2014 / N. Buetti, A. Atkinson, J. Marschall, A. Kronenberg // *BMJ Open*. – 2017. – Vol. 7. – P. e013665–69.

137. Buetti, N. COVID-19 increased the risk of ICU-acquired bloodstream infections: a case-cohort study from the multicentric IUTCOMEREA network / N. Buetti, S. Ruckly, E. de Montmollin, J. Reignier, N. Terzi, Y. Cohen, S. Siami, C. Dupuis, J.F. Timsit // *Intensive Care Med*. – 2021. – Vol. 47(1). – P. 180-187.

138. Carolus, H. *Candida albicans* and *Staphylococcus species*: a threatening twosome / H. Carolus, K. Van Dyck, P. Van Dijck // *Frontiers on Microbiology*. – 2019. – Vol. 10(art.2162). – P. 1–8.

139. Carpenter, L.L. C-reactive protein, early life stress and wellbeing in healthy adults / L.L. Carpenter, C.E. Gawug, A.R. Tyrka, L.H. Price // *Act Psychiatr Scand*. – 2012. – Vol. 126(6). – P. 402–410.

140. Carrara, L. Molecular diagnosis of bloodstream infections with a new dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR assay / L. Carrara, F. Navarro, M. Turbau, M. Seres, I. Moran, I. Quintana, R. Martino, Y. Gonzalez, A. Brell, O. Cordon, K. Diestra, C. Mata, B. Mirelis, P. Coll // *J Med Microbiol*. – 2013. – Vol. 62(11). – P. 1673–1679.

141. Carvalho, A.S. Bloodstream infections in neutropenic patients with haematological malignancies / A.S. Carvalho, D. Lagana, J. Catford, D. Shaw, N. Bak // *Infect Dis Health*. – 2020. – Vol. 25(1). – P. 22–29.

142. Catalya, S. COVID-19 with *Sporotrichosis* (aka *Sporothrix schenckii*) and *Fusobacterium* bloodstream infections (BSI) / S. Catalya, C. Shariat, M.C. Cloud // *J Infect Dis Epidemiol*. – 2021. – Vol. 7(5). – P. 210-212.

143. Chertow, G.M. *Ochrobactrum anthropi* bacteremia in a patient on hemodialysis / G.M. Chertow // *Am J Kidney Dis*. – 2000. – Vol. 35(6). – P. e30.1–e30.2

144. Chen, F.L. *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with central venous catheter infection / F.L. Chen, P.R. Hsuch, S.O. Teng, T-Y. Ou, W-S. Lee // *J Microbiol Immunol Infect*. – 2012. – Vol. 45(3). – P. 255–258.

145. Chen, C-H. *Tsukamurella tyrosinosolvans* bacteremia with coinfection of

*Mycobacterium bovis* pneumonia: case report and literature review / C-H. Chen, C-T. Lee, T-C. Chang // Springer Plus. – 2016. – Vol. 5. – P. 2033–2036.

146. Cheung, G.Y.C. *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils / G.Y.C. Cheung, K. Rigby, R. Wang, S. Queck, K.R. Braughton, A.R. Whitney, M. Teintze, F.R. DeLeo, M. Otto // PLoS Patog. – 2010. – Vol. 6(10). – P. e1001133–43.

147. Cilloniz, C. Bacteraemia in outpatients with community-acquired pneumonia / C. Cilloniz, A. Gabarrus, J. Almirall, R. Amaro, M. Rinaudo, C. Traverso, M. Niederman, A. Torres // Eur Respir J. – 2016. – Vol. 47. – P. 654–57.

148. CLSI. Principles and procedures for blood cultures; approved guideline. In CLSI document M47-A; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA. – 2007. – Vol. 27(17). – 51 p.

149. CLSI. A quality management system model for laboratory services: guideline QMS01, 5<sup>th</sup> edition; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA. – 2019. – Vol. 39(6). – 193 p.

150. Coburn, B. Does this adult patient with suspected bacteremia require blood cultures? / B. Coburn, A.M. Morris, G. Tomlinson, A.S. Detsky // JAMA. – 2012. – Vol. 308(5). – P. 502–11.

151. Cockerill III, F.R. Optimal testing parameters for blood cultures / F.R.III Cockerill, J.W. Wilson, E.A. Vetter, K.M. Goodman, C.A. Torgerson, W.S. Harmsen, C.D. Schleck, D.M. Ilstrup, J.A. Washington II, W.R. Wilson // Clin Infect Dis. – 2004. – Vol. 38. – P. 1724-1730.

152. Courjon, J. Patients with community-acquired bacteremia of unknown origin: clinical characteristics and usefulness of microbiological results for therapeutic issues: a single-center cohort study / J. Courjon, E. Demonchy, N. Degand, K. Risso, R. Ruimy, P-M. Roger // Ann Clin Microbiol Antimicrob. – 2017. – Vol. 16. – P. 40–47.

153. Cox, M.J. Co-infections: potentially lethal and unexplored in COVID-19 / M.J. Cox, N. Loman, D. Bogaert, J. O'Grady // Lancet Microbe. – 2020. – Vol. 1(1). – P. e11.

154. Cross, A. Patterns of bacteraemia aetiology / A. Cross, M.M. Levine // Lancet Infect Dis. – 2017. – Vol. 17(10). – P. 1005–1006.

155. Cunha, B.A. Fever of unknown origin: a clinical approach / B.A. Cunha, O. Lortholary, C. Cunha // *Am J Medicine*. – 2015. – Vol. 128. – P. 1138.E1–E15.

156. Dailey, P.J. Defining system requirements for simplified blood culture to enable widespread use in resource –limited settings / P.J. Dailey, J. Osborn, E.A. Ashley, E.J. Baron, D.A.B. Dance, D. Fusco, C. Fanello, Y.C. Manabe, M. Mokomane, P.N. Newton, B. Tessema, C. Isaacs, S. Dittrich // *Diagnostics*. – 2019. – Vol. 9(10). – P. 1–12.

157. Dalgaard, L.S. Risk and prognosis of bloodstream infections among patients on chronic hemodialysis: a population-based cohort study / L.S. Dalgaard, M. Norgaard, B. Jespersen, S. Jensen-Fangel, L.J. Ostergaard, H.C. Schonheyder, O.S. Sogaard // *Plos One*. – 2015. – Vol. 10(4). – P. 1–14.

158. Damgaard, C. Viable bacteria associated with red blood cells and plasma in freshly drawn blood donations / C. Damgaard, K. Magnussen, C. Enevold, M. Nilsson, T. Tolker-Nielsen, P. Holmstrup, C.H. Nielsen // *Plos One*. – 2015. – Vol. 10(3). – P. 1–9.

159. Dargere, S. Unique blood culture for diagnosis of bloodstream infections in emergency departments: a prospective multicentre study / S. Dargere, J.J. Parienti, E. Roupie, P.E. Gancel, E. Wiel, N. Smaiti, C. Loiez, L-M. Joly, L. Lemee, M. Pestel-Caron, D. du Cheyron, R. Verdon, R. Leclercq, V. Cattoir // *Clin Microbiol Infect*. – 2014. – Vol. 20. – P. 920–927.

160. Dat, V.Q. Clinical characteristics, organ failure, inflammatory markers and prediction of mortality in patients with community acquired bloodstream infection / V.Q. Dat, N.T. Long, V.N. Hieu, N.D.H. Phuc, N.V. Kinh, N.V. Trung, H.R. van Doorn, A. Bonell, B. Nadjm // *BMC Infect Dis*. – 2018. – Vol. 18. – P. 535–543.

161. Dat, V.Q. Bacterial bloodstream infections in a tertiary infectious diseases' hospital in Northern Vietnam: aetiology, drug resistance, and treatment outcome / V.Q. Dat, H.N. Vu, H.N. The, H.T. Nguyen, L.B. Hoang, D.V.T. Viet, C.L. Bui, K.V. Nguyen, T.V. Nguyen, D.T. Trinh, A. Torre, H.R. van Doorn, B. Nadjm, H.F.L. Wertheim // *BMC Infect Dis*. – 2017. – Vol. 17. – P. 493–504.

162. Deen, J. Community-acquired bacterial bloodstream infections in developing countries in south and southeast Asia: a systematic review / J. Deen, L. von Seidlein, F.

Andersen, N. Elle, N.J. White, Y. Lubell // *Lancet Infect Dis.* – 2012. – Vol. 12(6). – P. 480–487.

163. Dewinter, L.M. Human clinical isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* collected in Canada from 1999 to 2003 but not fitting reporting criteria for cases of diphtheria / L.M. Dewinter, K.A. Bernard, M.G. Romney // *J Clin Microb.* – 2005. – Vol. 43(7). – P. 3447–3449.

164. De Jager, C.P. Lymphocytopenia and neutrophil-lymphocyte count ratio predict bacteremia better than conventional infection markers in an emergency care unit / C.P. De Jager, P.T. van Wijk, R.B. Mathoera, J. de Jongh-Leuvenink, T. van der Poll, P.C. Wever // *Crit Care.* – 2010. – Vol. 14(5). – P. 192–200.

165. De Kraker, M.E.A. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia. Estimating the burden of antibiotic resistance in Europe / M.E.A. De Kraker, P.G. Davey, H. Grundmann // *PloS Med.* – 2011. – Vol. 8(10). – P. e1001104–12.

166. Deplano, A. National surveillance of *Staphylococcus epidermidis* recovered from bloodstream infections in Belgian hospitals / A. Deplano, S. Vandendriessche, C. Nonhoff, M. Dodemont, S. Roisin, O. Denis // *J Antimicrob Chemother.* – 2016. – Vol. 71. – P. 1815–1819.

167. Dhanalakshmi, V. Comparative study in early neonates with septicemia by blood culture, staining techniques and C-reactive protein (CRP) / V. Dhanalakshmi, E.S. Sivakumar // *J Clin Diagn Res.* – 2015. – Vol. 9(3). – P. DC12–15.

168. Dhotre, S. Assessment of periodontitis and its role in viridians streptococcal bacteremia and infective endocarditis / S. Dhotre, V. Jahagirdar, N. Suryawanshi, M. Davane, R. Patil, B. Nagoba // *Indian Heart J.* – 2018. – Vol. 70(2). – P. 225–232.

169. Dick, T. Vitamin B6 biosynthesis is essential for survival and virulence of *Mycobacterium tuberculosis* / T. Dick, U. Manjunatha, B. Kappes, M. Gengenbacher // *Molecular Microbiol.* – 2010. – Vol. 78(4). – P. 980–88.

170. Diekema, D.J. The microbiology of bloodstream infections: 20-year trends from the SENTRY antimicrobial surveillance program / D.J. Diekema, P.R. Hsueh, R.E. Mendes, M.A. Pfaller, K.V. Rolston, H.S. Sader, R.N. Jones // *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy. – 2019. – Vol. 63(7). – P. 1-10.

171. Dilnessa, T. Emerging blood culture technologies for isolation of blood pathogens at clinical microbiology laboratories / T. Dilnessa, G. Demeke, G. Mengistu, A. Bitew // *J Med Microb Diagn.* – 2016. – Vol. 5(2). – P. 1–7.

172. Duboc de Almeida, G.M. *Rhodotorula* spp. isolated from blood cultures: clinical and microbiological aspects / G.M. Duboc de Almeida, S.F. Costa, M. Melhem, A.L. Motta, M. Walderez, L. Pierrotti, M.N. Burattini, F. Miyashita, F. Rossi // *Medical Mycology.* – 2008. – Vol. 46(6). – P. 547–56.

173. Dubourg, G. Emerging methodologies for pathogen identification in positive blood culture testing / G. Dubourg, D. Raoult // *Expert Rev Mol Diagn.* – 2016. – Vol. 16(1). – P. 97–111.

174. Dunne, W.M. The Dark Art of Blood Cultures / W.M. Dunne, C-A.D. Burnham // In: *The Dark Art of Blood Cultures.* – ASM Press, Washington, DC, 2018. – P. 1–20.

175. Dlekema, D.J. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the Emerging Infections and the Epidemiology of Iowa Organisms study / D.J. Dlekema, S.A. Messer, A.B. Brueggemann, S.L. Coffman, G.V. Doern, L.A. Herwalt, M.A. Pfaller // *J Clin Microbiol.* – 2002. – Vol. 40. – P. 1298–1302.

176. Einsiedel, L.J. Two nations: racial disparities in bloodstream infections recorded at Alice Springs Hospital, central Australia, 2001–2005 / L.J. Einsiedel, R.J. Woodman // *Med J Aust.* – 2010. – Vol. 192(10). – P. 567–71.

177. Elantamilan, D. Comparative evaluation of conventional (manual) blood culture system and BacT/ALERT 3D (automated) blood culture system in a tertiary care hospital / D. Elantamilan, W.V. Lyngdoh, A. Banik, A.B. Khyriem, P. Bhattacharyya, J. Rajbongshi, A.C. Phukan // *Sch J App Med Sci.* – 2017. – Vol. 5(2D). – P. 544–49.

178. Eren, E. Diagnostic evaluation of micromethod erythrocyte sedimentation rate in pediatric infections / E. Eren, E. Comak, M. Ozturk, D. Canatan // *S.D.U. Tip Fak Derg.* – 2011. – Vol. 18(3). – P. 92–95.

179. Falcone, M. Risk factors and outcomes of endocarditis due to non-HACEK gram-negative bacilli: Data from the prospective multicenter Italian Endocarditis Study

Cohort / M. Falcone, G. Tisco, E. Durante-Mangoni, V. Ravasio, F. Barbaro, M.P. Ursi, M.B. Pasticci, M. Bassetti, P. Grossi, M. Venditti, M. Rizzi // *Antimicrob Agents Chemotherapy*. – 2018. – Vol. 62(4). – P. e02208–17.

180. Ferreira, L. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / L. Ferreira, F. Sánchez-Juanes, M. González-Ávila, D. Cembrero-Fucinos, A. Herrero-Hernandez, J.M. Gonzalez-Buitrago, J.L. Munoz-Bellido // *J Clin Microbiol*. – 2010. – Vol. 48. – P. 2110–2115.

181. Florio, W. Recent advances in the microbiological diagnosis of bloodstream infections / W. Florio, P. Morici, E. Ghelardi, S. Barnini, A. Lupetti // *Crit Rev Microbiol*. – 2018. – Vol. 44(3). – P. 351–70.

182. Fournier, P.E. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions / P.E. Fournier, M. Drancourt, P. Colson, J-M. Rolain, B.L. Scola, D. Raoult // *Nat Rev Microbiol*. – 2013. – Vol. 11(8). – P. 574–585.

183. Fracchiolla, N.S. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections in hematological malignancies: Results from a single-centre study / N.S. Fracchiolla, M. Sciume, N. Orofino, F. Guidotti, A. Grancini, F. Cavalca, A. Freyrie, M.C. Goldaniga, D. Consonni, V. Mattiello, L. Pettine, A. Cortelezzi // *PLoS One*. – 2019. – Vol. 14(5). – P. e0216715.

184. Fukui, S. Bacteraemia predictive factors among general medical inpatients: a retrospective cross-sectional survey in a Japanese university hospital / S. Fukui, Y. Uehara, K. Fujibayashi, O. Takahashi, T. Hisaoka, T. Naito // *BMJ Open*. – 2016. – Vol. 6. – P. e010527.

185. Garcia-Elorriaga, G. The usefulness of the buffy coat smear and panbacterial polymerase chain reaction in early diagnosis of neonatal sepsis / G. Garcia-Elorriaga, N. Cortes-Torres, J.C. Ballesteros-del-Olmo, G. del Rey-Pineda // *Revista de Investigación Clínica*. – 2012. – Vol. 64(3). – P. 275–283.

186. Garcia-Vazquez, E. When is coagulase-negative staphylococcus bacteraemia clinically significant? / E. Garcia-Vazquez, A. Fernandez-Rufete, A. Hernandez-Torres, M. Canteras, J. Ruiz, J. Gomez // *Scand J Infect Dis*. – 2013. – Vol. 45(9). – P. 664–671.



187. Gard, S.K. Polymicrobial blood stream infection: consensus definition is required / S.K. Gard, P. Gard // *Indian J Crit Care Med.* – 2017. – Vol. 21. – P. 712-713.

188. Gedik, H. Bloodstream infections in patients with hematological malignancies: which is more fatal – cancer or resistant pathogens? / H. Gedik, F. Simsek, A. Kanturk, T. Yildirmak, D. Arica, D. Aydin, N. Demirel, O. Yokus // *Ther Clin Risk Manag.* – 2014. – Vol. 10. – P. 743-752.

189. Giacobbe, D.R. Bloodstream infections in critically ill patients with COVID-19 / D.R. Giacobbe, D. Battaglini, L. Ball, I. Brunetti, B. Bruzzone, G. Codda, F. Crea, A. De Maria, C. Dentone, A. Di Biagio, G. Icardi, L. Magnasco, A. Marchese, M. Mikulska, A. Orsi, N. Patroniti, C. Robba, A. Signori, L. Taramasso, A. Vena, P. Pelost, M. Bassetti // *Eur J Clin Invest.* – 2020. – Vol. 50(10). – P. e13319.

190. Greisen, K. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid / K. Greisen, M. Loeffelholz, A. Purohit, D. Leong // *J Clin Microbiol.* – 1994. – Vol. 32(2). – P. 335–351.

191. Guajardo-Lara, C.E. Role of anaerobic blood culture in the simultaneous blood culture taking for the diagnosis of bacteremia / C.E. Guajardo-Lara, M.I. Saldana-Kamirez, J.J. Ayala-Gayton, S.B. Valdovinos-Chavez // *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* – 2016. – Vol. 54(3). – P. 292–296.

192. Haak, B.W. The role of the gut microbiota in sepsis / B.W. Haak, W.J. Wiersinga // *Lancet Gastroenterology and Hepatology.* – 2017. – Vol. 2. – P. 135–143.

193. Habib, G. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM) / G. Habib, P. Lancellotti, M.J. Antunes, M.G. Bongiorni, J-P. Casalta, F.D. Lotti, R. Dulgheru, G.E. Khoury, P.A. Erba // *Europ Heart J.* – 2015. – Vol. 36(44). – P. 3075–3123.

194. Hall, K.K. Updated review of blood contamination / K.K. Hall, J.A. Lyman // *Clin Microbiol Rev.* – 2006. – Vol. 19(4). – P. 788-802.

195. Hansen, G.T. Laboratory blood cultures: past, present, and future / G.T.

Hansen // *Clin Microbiol Newsl.* – 2016. – Vol. 38(15). – P. 119–128.

196. Hirai, Y. Candidemia diagnosed from peripheral blood smears: case report and review of literature 1954-2013 / Y. Hirai, S. Asahata, Y. Ainoda, T. Fujita, H. Miura, N. Hizuka, K. Kikuchi // *Mycopathologia.* – 2015. – Vol. 180(1-2). – P. 111-16.

197. Hoenigl, M. Characteristics of hospital-acquired and community-onset blood stream infections, South-East Austria / M. Hoenigl, J. Wagner, R.B. Raggam, F. Pruessler, J. Prattes, S. Eigl, E. Leitner, K. Honigl, T. Valentin, I. Zollner-Schwetz // *Plos One.* – 2014. – Vol. 9(8). – P. e104702.

198. Holmbom, M. 14-year survey in a Swedish country reveals a pronounced increase in bloodstream infections (BSI). Comorbidity – an independent risk factor for both BSI and mortality / M. Holmbom, C.G. Giske, M. Fredrikson, A.O. Balkhed, C. Claesson, L.E. Nilsson, M. Hoffmann, H. Hanberger // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11(11). – P. e0166527.

199. Huang, X.X. Accelerated bacterial detection in blood culture by enhanced acoustic flow cytometry (AFC) following peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH) / X.X. Huang, N. Urosevic, T.J.J. Inglis // *PloS One.* – 2019. – Vol. 14(2). – P. e0201332.

200. Huerta, L.E. Factors associated with recurrence and mortality in central line-associated bloodstream infections: a retrospective cohort study / L.E. Huerta, G.E. Nelson, T.G. Stewart, T.W. Rice // *Critical Care.* – 2018. – Vol. 22. – P. 266–274.

201. Hughes, S. Bacterial and fungal coinfection among hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study in a UK secondary-care setting / S. Hughes, O. Troise, H. Donaldson, N. Mughal, L.S.P. Moore // *Clin Microbiol Infect.* – 2020. – Vol. 26. – P. 1395-1399.

202. Hugon, P. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings / P. Hugon, J-C. Dufour, P. Colson, P-E. Fournier, K. Sallah, D. Raoult // *Lancet Infect Dis.* – 2015. – Vol. 15(10). – P. 1211–1219.

203. Huson, M.A.M. Community –acquired bacterial bloodstream infections in HIV – infected patients: a systematic review / M.A.M. Huson, S.M. Stolp, T. van der Poll, M.P. Grobusch // *Clin Inf Dis.* – 2014. – Vol. 58(1). – P. 79–92.

204. Hussein, K. *Campylobacter* bacteraemia: 16 years of experience in a single centre / K. Hussein, A. Raz-Pasteur, Y. Shachor-Meyouhas, Y. Geffen, L. Oren, M.P. Kassis // *Infect Dis.* – 2016. – Vol. 48(11-12). – P. 796–799.

205. Hsu, M.S. Clinical features, antimicrobial susceptibilities, and outcomes of *Elizabethkingia meningoseptica* (*Chryseobacterium meningosepticum*) bacteremia at a medical center in Taiwan, 1999–2006 / M.S. Hsu, C.H. Liao, Y.T. Huang, C-Y. Liu, C-J. Yang, K-L. Kao, P-R. Hsueh // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2011. – Vol. 30(10). – P. 1271–1278.

206. Idelevich, E.A. Direct blood culturing on solid medium outperforms an automated continuously monitored broth-based blood culture system in terms of time to identification and susceptibility testing / E.A. Idelevich, B. Grunastel, G. Peters, K. Becker // *New Microbe and New Infect.* – 2016. – Vol. 10. – P. 19–24.

207. Idelevich, E.A. New microbiological techniques in the diagnosis of bloodstream infections / E.A. Idelevich, U. Reischl, K. Becker // *Dtsch Arztebl Int.* – 2018. – Vol. 115. – P. 822–832.

208. Idelevich, E.A. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium / E.A. Idelevich, I. Schule, B. Grunastel, J. Wullenweber, G. Peters, K. Becker // *Clin Microbiol Inf.* – 2014. – Vol. 20(10). – P. 1001–1006.

209. Ino, K. Bacteremia due to *Leuconostoc pseudomesenteroides* in a patient with acute lymphoblastic leukemia: case report and review of the literature / K. Ino, K. Nakase, K. Suzuki, A. Nakamura, A. Fujieda, N. Katayama // *Case Reports Hematology.* – 2016. – Vol. 2016(ID7648628). – P. 1–4.

210. Inoue, M. A case of fungemia which, was detected phagocytized by neutrophils in peripheral blood smear / M. Inoue, S. Kamiyama, M. Hayakawa // *Jpn J Soc Lab Hematol.* – 2010. – Vol. 11. – P. S81.

211. Ishiyama, K. *Leuconostoc* bacteremia in three patients with malignancies / K. Ishiyama, H. Yamazaki, S. Nakao, Y. Senda, H. Yamauchi // *J Infect Chemotherapy.* – 2011. – Vol. 17(3). – P. 412–418.

212. Islas-Munoz, B. Bloodstream infections in cancer patients. Risk factors

associated with mortality / B. Islas-Munoz, P. Volkow-Fernandez, C. Ibanes-Gutierrez, A. Villamar-Ramirez, D. Vilar-Compte, P. Cornejo-Juarez // *Internal J Infect Dis.* – 2018. – Vol. 71. – P. 59–64.

213. Jensen, U.S. Recurrent bacteraemia: A 10-year regional population-based study of clinical and microbiological risk factors / U.S. Jensen, J.D. Knudsen, C. Ostergaard, K.O. Gradel, N. Frimodt-Moller, H.C. Schonheyder // *J Infection.* – 2010. – Vol. 60(3). – P. 191–199.

214. Jensen, U.S. Risk factors for recurrence and death after bacteraemia: a population-based study / U.S. Jensen, J.D. Knudsen, S. Wehberg, D.B. Gregson, K.B. Laupland // *Clin Microbiol Infect.* – 2011. – Vol. 17(8). – P. 1148–1154.

215. Jeong, S. Diagnostic utilities of procalcitonin and C-reactive protein for the prediction of bacteremia determined by blood culture / S. Jeong, Y. Park, Y. Cho, H-S. Kim // *Clin Chim Acta.* – 2012. – Vol. 413(21-22). – P. 1731–1736.

216. Jones, D.J. Oral care and the risk of bloodstream infections in mechanically ventilated adults: A review / D.J. Jones, C.L. Munro // *Intensive Crit Care Nurs.* – 2008. – Vol. 24(3). – P. 152–161.

217. Just, E. Understanding risk stratification, comorbidities, and the future of healthcare / E. Just // *Health Catalyst.* – 2017. – V. 25. – P. 1–8.

218. Kaitwatcharachai, C. An outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia in hemodialysis patients: an epidemiologic and molecular study / C. Kaitwatcharachai, K. Silpapojakul, S. Jitsurong, S. Kalnauwakul // *Am J Kidney Dis.* – 2000. – Vol. 36(1). – P. 199–204.

219. Kaminami, K.N.K. Picture in clinical hematology Candidiasis diagnosed with the blood smear specimens / K.N.K. Kaminami, K. Nakayama, N. Minoura, T. Ogawa, Y. Hara, Y. Nakamura // *Rinsho Ketsueki.* – 2011. – Vol. 52(11). – P. 1749.

220. Kang, S.J. Factors affecting the clinical relevance of *Corynebacterium striatum* isolated from blood cultures / S.J. Kang, S-M. Choi, J-A. Choi, J.U. Choi, T-H. Oh, S.E. Kim, U.J. Kim, E.J. Won, H-C. Jang, K-H. Park, J.H. Shin, S-S. Kweon, S-I. Jung // *Plos One.* – 2018. – Vol. 13(6). – P. e0199454.

221. Kang, C.J. Liver cirrhosis as a risk factor for mortality in a national cohort of

patients with bacteremia / S.J. Kang, J.H. Song, D.R. Chung, K.R. Peck, J-S. Yeom, H.K. Ki, J.S. Son, J.S. Lee, Y-S. Kim, S-I. Jung, S-W. Kim, H-H. Chang, S.Y. Ryu, K.T. Kwon, H. Lee, D.S. Jung, C. Moon, S.T. Heo, E.S. Kim, J-Y. Rhee // *J Infect.* – 2011. – Vol. 63(5). – P. 336–343.

222. Kanoksil, M. Epidemiology, microbiology and mortality associated with community-acquired bacteremia in northeast Thailand: A multicenter surveillance study / M. Kanoksil, A. Jatapai, S.J. Peacock // *Plos One.* – 2013. – Vol. 8(1). – P. e54714.

223. Kazanji, N. Monomicrobial vs polymicrobial *Clostridium difficile* bacteremia: a case report and review of the literature / N. Kazanji, M. Gjeorgjievski, S. Yadav, A.N. Mertens, C. Lauter // *Am J Medicine.* – 2015. – Vol. 128. – P. e19–e26.

224. Khanna, S. The epidemiology of community acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study / S. Khanna, D. Pardi, D. Aronson, P.P. Kammer, R. Orenstein, J.L. St. Sauver, W.S. Harmsen, A.R. Zinsmeister // *Am J Gastroenterology.* – 2012. – Vol. 107(1). – P. 89–95.

225. Kim, D.Y. The usefulness of procalcitonin and C-reactive protein as early diagnostic markers of bacteremia in cancer patients with febrile neutropenia / D.Y. Kim, Y.S. Lee, S. Ahn, Y.H. Chun, K.S. Lim // *Cancer Res Treat.* – 2011. – Vol. 43(3). – P. 176–180.

226. Kirn, T.J. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret / T.J. Kirn, M.P. Weinstein // *Clin Microbiol Infect.* – 2013. – Vol. 19. – P. 513–520.

227. Klausegger, A. Gram type-specific broad-range PCR amplification for rapid detection of 62 pathogenic bacteria / A. Klausegger, M. Hell, A. Berger, K. Zinober, S. Baier, N. Jones, W. Sperl, B. Kofler // *J Clin Microbiol.* – 1999. – Vol. 37(2). – P. 464–466.

228. Koch, A.M. Mortality related to hospital-associated infections in a tertiary hospital; repeated cross-sectional studies between 2004-2011 / A.M. Koch, R.M. Nilsen, H.M. Eriksen, R.J. Cox, S. Harthug // *Antimicrob Resist Infect Control.* – 2015. – Vol. 4. – P. 57–65.

229. Kolpashchikov, D.M. Evolution of hybridization probes to DNA machines

and robots / D.M. Kolpashchikov // *Acc Chem Res.* – 2019. – Vol. 52(7). – P. 1949–1956.

230. Kutty, G.A. Role of micro-ESR in the evaluation of suspected sepsis in neonates / G.A. Kutty, A.S. Prabhu, K.S. Sahana // *Intern J of Science and Research (IJSR).* – 2015. – Vol. 4(8). – P. 311–314.

231. Kwon, H.J. Megalocytic interstitial nephritis following acute pyelonephritis with *Escherichia coli* bacteremia: a case report / H.J. Kwon, K.H. Yoo, I.Y. Kim, S. Lee, H.R. Jang, G.Y. Kwon // *J Korean Med Sci.* – 2015. – Vol. 30. – P. 110–114.

232. Kyaw, H. *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis and cerebrovascular accident: A systemic review of risk factors and clinical outcome / H. Kyaw, F. Raju, A.Z. Shaikh, A.N. Lin, A.T. Lin, J. Abboud, S. Reddy // *Cureus.* – 2018. – Vol. 10(4). – P. e2469.

233. Lafaurie, M. Utility of anaerobic bottles for the diagnosis of bloodstream infections / M. Lafaurie, E. d'Anglejan, J.L. Donay, D. Glotz, E. Sarfati, M. Mimoun, M. Legrand, E. Oksenhendler, M. Bagot, S. Valade, B. Bercot, J.M. Molina // *BMC Infect Dis.* – 2020. – Vol. 20. – P. 142–148.

234. Lagier, J-C. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota / J-C. Lagier, P. Hugon, S. Khelaifia, P-E. Fournier, B. La Scola, D. Raoult // *Cl Microb Rev.* – 2015. – Vol. 28(1). – P. 237–264.

235. Lagier, J-C. Microbial culturomics: Paradigm shift in the human gut microbiome study / J-C. Lagier, F. Armougom, M. Million, P. Hugon, I. Pagnier, C. Robert, F. Bittar, G. Fournous, G. Gimenez, M. Maraninchi, J.F. Trape, E.V. Koonin, B. La Scola, D. Raoult // *Clin Microbiol and Infect.* – 2012. – Vol. 18(12). – P. 1185–1193.

236. Lagier, J-C. Many more microbes in humans: enlarging the microbiome repertoire / J-C. Lagier, M. Drancourt, R. Charrel, F. Bittar, B. La Scola, S. Panque, D. Raoult // *Clin Infect Dis Press.* – 2017. – Vol. 65(Suppl.1). – P. s20–s29.

237. Lagier, J-C. Culturing the human microbiota and culturomics / J-C. Lagier, G. Dubourg, M. Million, F. Cadoret, M. Bilen, F. Fenollar, A. Levasseur, J-M. Rolain, P-E. Fournier, D. Raoult // *Nature Reviews Microbiology.* – 2018. – Vol. 16. – P. 540–50.

238. Lagier, J-C. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology / J-C. Lagier, S. Edouard, I. Pagnier, O. Mediannikov, M. Drancourt, D. Raoult // *Clin Microbiol Rev.* – 2015. – Vol. 28(1). – P. 208–236.

239. Lagier, J-C. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics / J-C. Lagier, S. Khelaifia, M.T. Alou, S. Ndongo, N. Dione, P. Hugon, A. Caputo, F. Cadoret, S.I. Traore, E.H. Seck, G. Dubourg, G. Durand, G. Mourembou, E. Guilhot, A. Togo, S. Bellali, D. Bachar, N. Cassir, F. Bittar, J. Delerce, M. Mailhe, D. Ricaboni, M. Bilen, N.P.M.D. Nieko, N.M.D. Badiane, C. Valles, D. Mouelhi, K. Diop, M. Million, D. Musso, J. Abrahao, E.I. Azhar, F. Bibi, M. Yasir, A. Diallo, C. Sokhna, F. Djossou, V. Vitton, C. Robert, J.M. Rolain, B. La Scola, P-E. Fournier, A. Levasseur, D. Raoult // *Nature Microbiology.* – 2016. – Vol. 1. – P. 1–8.

240. Lam, S. Peripheral blood candidiasis / S. Lam, C.C. Hsia // *Blood.* – 2012. – Vol. 119(21). – P. 4822.

241. Lamy, B. How to optimize the use of blood cultures for the diagnosis of bloodstream infections? A state-of-the art / B. Lamy, S. Dargere, M.C. Arendrup, J-J. Parienti, P. Tattevin // *Front Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 1-13.

242. Laupland, K.B. Population-based epidemiology and microbiology of community-onset bloodstream infections / K.B. Laupland, D.L. Church // *Clin Microbiol Rev.* – 2014. – Vol. 27(4). – P. 647–64.

243. Laupland, K.B. Population-based laboratory assessment of the burden of community-onset bloodstream infection in Victoria, Canada / K.B. Laupland, P.C. Kibsey, D.B. Gregson, J.C. Galbraith // *Epidemiol Infect.* – 2013. – Vol. 141(1). – P. 174–180.

244. Laupland, K.B. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study / K.B. Laupland, O. Lyytilainen, M. Sogaard, K.J. Kennedy, J.D. Knudsen, C. Ostergaard, J.C. Galbraith, L. Valiquette, G. Jacobsson, P. Collignon, H.C. Schonheyder // *Clin Microbiol Infect.* – 2013. – Vol. 19(5). – P. 465–471.

245. Laupland, K.B. *Salmonella enterica* bacteraemia: a multi-national population-based cohort study / K.B. Laupland, H.C. Schonheyder, K.J. Kennedy, O.

Lyytikäinen, L. Valiquette, J.C. Galbraith, P. Collignon // BMC Infectious Diseases. – 2010. – Vol. 10. – P. 95–101.

246. Laupland, K.B. Long-term mortality associated with community-onset bloodstream infection / K.B. Laupland, L.W. Svenson, D.B. Gregson, D.L. Church // Infection. – 2011. – Vol. 39(5). – P. 405–410.

247. Leber, A.L. Blood cultures / A.L. Leber // In: Clinical Microbiology Procedures Handbook – 4<sup>th</sup> edition. Washington, DC: ASM Press, 2016. – P. 1–8.

248. Lee, C.C. Age-related trends in adults with community-onset bacteremia / C.C. Lee, J.L. Wang, C.H. Lee, Y.P. Hung, M.Y. Hong, C.M. Chang, W.C. Ko // Antimicrob Agents Chemother. – 2017. – Vol. 61(12). – P. e01050–17.

249. Leitao, T.M.J.S. Accuracy of buffy coat in the diagnosis of disseminated histoplasmosis in AIDS-patients in an endemic area of Brazil / T.M.J.S. Leitao, A.M.P.O. Fiho, J.E.P.S. Filho, B.M. Tavares, J.R.L. Mesquita, L.A.B.G. Farias, R.S. Mota, M. Nacher, L.S. Damasceno // J Fungi. – 2019. – Vol. 5(2). – P. 47–55.

250. Lenz, R. The distinct category of healthcare associated bloodstream infections / R. Lenz, J.R. Leal, D.L. Church, D.B. Gregson, T. Ross, K.B. Laupland // BMC Infect Dis. – 2012. – Vol. 12. – P. 85–90.

251. Li, G. Comparison of the performance of three blood culture systems in a Chinese tertiary-care hospital / G. Li, J. Sun, S. Pan, W. Li, S. Zhang, Y. Wang, X. Sun, H. Xu, L. Ming // Front Cell Infect Microbiol. – 2019. – Vol. 9. – P. 285–294.

252. Liang, S.Y. Vital signs: central line-associated blood stream infections—United States, 2001, 2008, and 2009 / S.Y. Liang, J. Marschall // Morb Mortal Wkly Rep. – 2011. – Vol. 60. – P. 243–248.

253. Liapis, K. *Candida parapsilosis* in the blood smear of an injection drug user / K. Liapis // CMAJ. – 2011. – Vol. 183(13). – P. 1515.

254. Liderot, K. Polymicrobial bloodstream infection with *Eggerthella lenta* and *Desulfovibrio desulfuricans* / K. Liderot, M. Larsson, S. Borang, V. Ozenci // J Clin Microb. – 2010. – Vol. 48(10). – P. 3810–3812.

255. Lillie, P.J. Long-term mortality following bloodstream infection / P.J. Lillie, J. Allen, C. Hall, C. Walsh, K. Adams, H. Thaker, P. Moss, G.D. Barlow // Clin Microbiol



Inf. – 2013. – Vol. 19. – P. 955–60.

256. Lin, H-H. Evaluation of the blood volume effect on the diagnosis of bacteremia in automated blood culture systems / H.H. Lin, Y-F. Liu, N. Tien, C-M. Ho, L-N. Hsu, J-J. Lu // *J Microb Immunol Infect.* – 2013. – Vol. 46(1). – P. 48–52.

257. Lin, L. *Aspergillus niger* bloodstream infection in gastric cancer after common hepatic artery embolization: A case report / L. Lin, C-H. Zhao, X-Y. Yin, Y-L. Chen, H-Y. Zhai, C-W. Xu, Y. Wang, F-J. Ge, J-M. Xu // *Experimental Therapeutic Medicine.* – 2017. – Vol. 14. – P. 1427–1432.

258. Lipsky, B.A. Predicting bacteremia among patients hospitalized for skin and skin-structure infections: derivation and validation of a risk score / B.A. Lipsky, M.H. Kollef, L.G. Miller, X. Sun, R.S. Johannes, Y.P. Tabak // *Infect Control Hosp Epidemiol.* – 2010. – Vol. 31(8). – P. 828–837.

259. Litao, M.K.S. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein: how best to use them in clinical practice / M.K.S. Litao, D. Kamat // *Pediatric Annals.* – 2014. – Vol. 43(10). – P. 417–420.

260. Loonen, A.J.M. Developments for improved diagnosis of bacterial bloodstream infections / A.J.M. Loonen, P.F.G. Wolffs, C.A. Bruggeman, A.J.C. van den Brule // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2014. – Vol. 33(10). – P. 1687–1702.

261. Marchaim, D. Epidemiology of bacteremia episodes in a single center: increase in Gram-negative isolates, antibiotics resistance, and patient age / D. Marchaim, R. Zaidenstein, T. Lazarovitch, Y. Karpuch, T. Ziv, M. Weinberger // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2008. – Vol. 27(11). – P. 1045-51.

262. Manzoni, D. Diagnosis of bacteremia on a blood smear / D. Manzoni, P. Sujobert // *Blood.* – 2015. – Vol. 125(13). – P. 2173.

263. Maraj, B. Acute colitis in a patient with *Streptococcus pyogenes* bacteremia / B. Maraj, A. Huang, S. Patel // *Am J Medicine.* – 2018. – Vol. 131(1). – P. 13–14.

264. Marin, M. Bloodstream infections in patients with solid tumors. Epidemiology, antibiotic therapy, and outcomes in 528 episodes in a single cancer center / M. Marin, C. Gudiol, C. Garcia-Vidal, C. Ardanuy, J. Carratala // *Medicine.* – 2014. – Vol. 93(3). – P. 143–149.

265. Marschal, M. Evaluation of the accelerate pheno system for fast identification and antimicrobial susceptibility testing from positive blood cultures in bloodstream infections caused by gram-negative pathogens / M. Marschal, J. Bachmaier, I. Autenrieth, P. Oberhettinger, M. Willmann, S. Peter // *J Clin Microbiol.* – 2017. – Vol. 55(7). – P. 2116–2126.

266. Martinez, R.M. Bloodstream infections / R.M. Martinez, D.M. Wolk // *Microbiol Spectr.* – 2016. – Vol. 4(4). – P. 1–34.

267. Martins, F.S. Suspected infection in afebrile patients. Are they septic? / F.S. Martins, G.G. Guedes, T.M. Santos, M.A. de Carvalho-Filho // *Medicine.* – 2017. – Vol. 96(10). – P. e6299.

268. Masucci, L. Culturomics: bacterial species isolated in 3 healthy donors for faecal microbiota transplantation in *Clostridium difficile* infection / L. Masucci, G. Quaranta, D. Nagel, S. Primus, L. Romano, R. Graffeo, G. Ianiro, A. Gasbarrini, G. Cammarota, M. Sanguinetti // *Microbiologia Medica.* – 2017. – Vol. 32. – P. 6510–6513.

269. Mauerhofer, L-M. Methods for quantification of growth and productivity in anaerobic microbiology and biotechnology / L-M. Mauerhofer, P. Pappenreiter, C. Paulik, A.H. Seifert, S. Bernacchi, S.K-M.R. Rittmann // *Folia Microbiol.* – 2019. – Vol. 64(3). – P. 321–360.

270. Mc Namara, J.K. Long-term morbidity and mortality following bloodstream infection: A systematic literature review / J.K. Mc Namara, E. Righi, H. Wright, G.F. Hartel, P.N.A. Harris, D.L. Paterson // *J Infection.* – 2018. – Vol. 77(1). – P. 1–8.

271. Mehl, A. Burden of bloodstream infection in an area of Mid-Norway 2002-2013: a prospective population-based observational study / A. Mehl, B.O. Asvold, S. Lydersen, J. Paulsen, E. Solligard, J.K. Damas, S. Harthug, T-H. Edna // *BMC Infect Dis.* – 2017. – Vol. 17(1). – P. 205–219.

272. Micek, S.T. Bacteremia increases the risk of death among patients with soft-tissue infections / S.T. Micek, A.P. Hoban, V. Pham, J.A. Doherty, M.D. Zilberberg, A.F. Shorr, M.H. Kollef // *Surg Infect (Larchmt).* – 2010. – Vol. 11(2). – P. 169–176.

273. Miller, N.S. Comparison of BD Bactec Plus blood culture media to VersaTREK Redox blood culture media for detection of bacterial pathogens in simulated

adult blood cultures containing therapeutic concentrations of antibiotics / N.S. Miller, D. Rogan, B.L. Orr, D. Whitney // *J Clin Microbiol.* – 2011. – Vol. 49(4). – P. 1624–1627.

274. Minasyan, H. Bactericidal capacity of erythrocytes in human cardiovascular system / H. Minasyan // *Internat Clin Pathol J.* – 2016. – Vol. 2(5). – P. 52–57.

275. Minasyan, H. Erythrocyte: bacterial killer and bacteria pray / H. Minasyan // *Internat J Immunol.* – 2015. – Vol. 3(1). – P. 1–7.

276. Miltiadous, G. Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature / G. Miltiadous, M. Elisaf // *J Medical Case Reports.* – 2011. – Vol. 5. – P. 251–253.

277. Mitteregger, D. Neutralization of antimicrobial substances in new BacT/Alert FA and FN Plus blood culture bottles / D. Mitteregger, W. Barousch, M. Nehr, M. Kundi, M. Zeitlinger, A. Makristathis, A.M. Hirschl // *J Clin Microbiol.* – 2013. – Vol. 51(5). – P. 1534–1540.

278. Morens, D.M. The challenge of emerging and reemerging infectious diseases / D.M. Morens, G.K. Folkers, A.C. Fauci // *Nature.* – 2004. – Vol. 30(6996). – P. 242–249.

279. Murohashi, K. Clinical significance of Charlson comorbidity index as a prognostic parameter for patients with acute or subacute idiopathic interstitial pneumonias and acute exacerbation of collagen vascular diseases-related interstitial pneumonia / K. Murohashi, Y. Hara, Y. Saigusa, N. Kobayashi, T. Sato, M. Yamamoto, M. Kudo, T. Kaneko // *J Thorac Dis.* – 2019. – Vol. 11(6). – P. 2448–2457.

280. Musicha, P. Trends in antimicrobial resistance in bloodstream infection isolates at a large urban hospital in Malawi (1998–2016): a surveillance study / P. Musicha, J.E. Cornick, N. Bar-Zeev, N. French, C. Masesa, B. Denis, N. Kennedy, J. Mallewa, M.A. Gordon, C.L. Msefula, R.S. Heyderman, D.B. Everett, N.A. Feasey // *Lancet Infect Dis.* – 2017. – Vol. 17(10). – P. 1042–1052.

281. Mylonakis, E. T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: a clinical trial / E. Mylonakis, C.J. Clancy, L. Ostrosky-Zeichner, K.W. Garey, G.J. Alangaden, J.A. Vazquez, J.S. Groeger, M.A. Judson, Y-M. Vinagre, S.O. Heard, F.N. Zervou, I.M. Zacharioudakis, D.P. Kontoyiannis // *Clin Infect*

Dis. – 2015. – Vol. 60(6). – P. 892–899.

282. Nagy, E. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories / E. Nagy, L. Boyanova, U.S. Justesen // *Clin Microbiol Infect.* – 2018. – Vol. 24. – P. 1139–1148.

283. Nathan, C. Antibiotic resistance – problems, progress, and prospects / C. Nathan, O. Cars // *N Engl J Med.* – 2014. – Vol. 371(19). – P. 1761–1763.

284. Navadeep, R.K. Study of bacteremia in patients with cellulitis of legs / R.K. Navadeep, B.M. Ramesh, M.A. Neema // *International J Recent Scientific Research.* – 2017. – Vol. 8(5). – P. 17045–17046.

285. Nguyen, T.H. Host response to *Staphylococcus epidermidis* colonization and infections / T.H. Nguyen, M.D. Park, M. Otto // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* – 2017. – Vol. 7. – P. 1–7.

286. Niazi, S.A. *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from refractory endodontic lesions are opportunistic pathogens / S.A. Niazi, D. Clarke, T. Do, S.C. Gilbert, F. Mannocci, D. Beighton // *J Clin Microb.* – 2010. – Vol. 48(11). – P. 3859–3869.

287. Nielsen, S.L. Decreasing incidence rates of bacteremia: a 9-year population-based study / S.L. Nielsen, C. Pedersen, T.G. Jensen, K.O. Gradel, H.J. Kolmos, A.T. Lassen // *J Infect.* – 2014. – Vol. 69(1). – P. 51–59.

288. Njunda, A.L. Comparing the buffy coat and traditional blood smears in the microscopic diagnosis of malaria / A.L. Njunda, D.S. Nsagha, J.C.N. Assob, T.D.B. Kwenti, N.L. Giwe, T.E. Kwenti // *Intern J Malaria Res Rev.* – 2014. – Vol. 2(2). – P. 7–12.

289. Ntusi, N. Guideline for the optimal use of blood cultures / N. Ntusi, L. Aubin, S. Oliver, A. Whitelaw, M. Mendelson // *South African Med J.* – 2010. – Vol. 100(12). – P. 839–43.

290. O`Grady, N.P. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections / N.P. O`Grady, M. Alexander, A. Burns, E.P. Dellinger, J. Garland, S.O. Heard, P.A. Lipsett, H. Masur, L.A. Mermel, M.L. Pearson, I.I. Raad, A.G. Randolph, M.E. Rupp, S. Saint // *Am J Infect Control.* – 2011. – Vol. 39(4, Suppl 1). – P. 1–34.

291. Ombelet, S. Clinical bacteriology in low-resource settings: today's solutions / S. Ombelet, J-B. Ronat, T. Walsh, C.P. Yansouni, J. Cox, E. Vlieghe, D. Martiny, M. Semret, O. Vandenberg, J. Jacobs // *The Lancet Infect Dis.* – 2018. – Vol. 18. – P. e248–e258.

292. Oksuz, L. Procalcitonin and C-reactive protein in differentiating to contamination from bacteremia / L. Oksuz, A. Somer, N. Salman, O. Erk, N. Gurler // *Braz J Microbiol.* – 2014. – Vol. 45(4). – P. 1415–1421.

293. Olaechea, P.M. Morbidity and mortality associated with primary and catheter-related bloodstream infections in critically ill patients / P.M. Olaechea, M. Palomar, F. Alvarez-Lerma, J.J. Otal, J. Insausti, M.J. Lopez-Pueyo // *Rev Esp Quimioter.* – 2013. – Vol. 26(1). – P. 21–29.

294. Ombelet, S. Best practices of blood cultures in low-and middle-income countries / S. Ombelet, B. Barbe, D. Affolabi, J-B. Ronat, P. Lompo, O. Lunguya, J. Jacobs, L. Hardy // *Front Med.* – 2019. – Vol. 6. – P. 1–27.

295. Opota, O. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art / O. Opota, A. Croxatto, G. Prodhom, G. Greub // *Clin Microbiol Infect.* – 2015. – Vol. 21. – P. 313–322.

296. Opota, O. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood / O. Opota, K. Jaton, G. Greub // *Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* – 2015. – Vol. 21. – P. 323–331.

297. Pagnier, H. Opportunistic infections caused by *Shewanella*, new emergent bacteria / H. Pagnier, P. Berche // *Medecine et Maladies Infectieuses.* – 2005. – Vol. 35(4). – P. 186–191.

298. Pallen, M.J. Diagnostic metagenomics: potential applications to bacterial, viral and parasitic infections / M.J. Pallen // *Parasitology.* – 2014. – Vol. 141. – P. 1856–1862.

299. Park, H.J. Clinical significance of *Propionibacterium acnes* recovered from blood cultures: analysis of 524 episodes / H.J. Park, S. Na, S.Y. Park, S.M. Moon, O-H. Cho, K-H. Park, Y.P. Chong, S-H. Kim, S-O. Lee, Y.S. Kim, J.H. Woo, M-N. Kim, S-H. Shoi // *J Clin Microb.* – 2011. – Vol. 49(4). – P. 1598–1601.

300. Pasqualini, L. Diagnostic performance of a multiple real-time PCR Assay in patients with suspected sepsis hospitalized in an internal medicine ward / L. Pasqualini, A. Mencacci, C. Leli, P. Montagna, A. Cardaccia, E. Cenci, I. Montecarlo, M. Pirro, F. di Filippo, E. Cistaro, G. Schillaci, F. Bistoni, E. Mannarino // *J Clin Microbiol.* – 2012. – Vol. 50(4). – P. 1285–1288.

301. Patel, R. MALDI-ToF MS for the diagnosis of infectious diseases / R. Patel // *Clin Chemistry.* – 2015. – Vol. 61(1). – P. 100–111.

302. Patel, R. Optimized pathogen detection with 30- compared to 20-milliliter blood culture draws / R. Patel, E.A. Vetter, W.S. Harmsen, C.D. Schleck, H.J. Fadel, F.R. Cockerill 3rd // *J Clin Microbiol.* – 2011. – Vol. 49(12). – P. 4047–4051.

303. Pathipa, E.I.P. Usefulness of 16S rDNA sequencing for the diagnosis of infective endocarditis caused *Corynebacterium diphtheriae* / E.I.P. Pathipa, T. Menon, N. Kumar, T. Francis // *J Med Microbiol.* – 2012. – Vol. 61(Pt8). – P. 1159–1161.

304. Patton, R.G. Innovation for reducing blood culture contamination: initial specimen diversion technique / R.G. Patton, T. Schmitt // *J Clin Microb.* – 2010. – Vol. 48(12). – P. 4501–4503.

305. Paulsen, J. Epidemiology and outcome of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection and sepsis in a Norwegian country 1996-2011: an observational study / J. Paulsen, A. Mehl, A. Askim, E. Solligard, B.O. Asvold, J.K. Damas // *BMC Infect Dis.* – 2015. – Vol. 15. – P. 116–126.

306. Peker, N. Diagnostic of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from blood samples: recent developments in molecular approaches / N. Peker, N. Couto, B. Sinha, J.W. Rossen // *Clin Microbiol Infect.* – 2018. – Vol. 24. – P. 944–955.

307. Pereira, G.H. Nosocomial infections caused by *Elizabethkingia meningoseptica*: an emergent pathogen / G.H. Pereira, D.O. Garcia, C.S. Abboud, V.L.B. Barbosa, P.S.L. da Silva // *Garcia C S Brazilian J Infect Dis.* – 2013. – Vol. 17(5). – P. 606–609.

308. Pfliegerer, A. Culturomics identified 11 new bacterial species from a single anorexia nervosa stool sample / A. Pfliegerer, J-C. Lagier // *European J of Clin Microb.*

– 2013. – Vol. 32(11). – P. 1471–1481.

309. Pien, B.C. The clinical and prognostic importance of positive blood cultures in adults / B.C. Pien, P. Sundaram, N. Raoof, S.F. Costa, S. Mirrett, C.W. Woods, L.B. Reller, M.P. Weinstein // *Amer J of Medicine*. – 2010. – Vol. 123(9). – P. 819–828.

310. Plebani, M. Diagnostic errors and laboratory medicine – causes and strategies / M. Plebani // *J Intern Feder Clin Chem Lab Med*. – 2015. – Vol. 26(1). – P. 7–14.

311. Plebani, M. Performance criteria and quality indicators for the pre-analytical phase / M. Plebani, L. Sciacovelli, A. Aita, M. Pelloso, M.L. Chiozza // *Clin Chem Lab Med*. – 2015. – Vol. 53(6). – P. 943–948.

312. Procop, G.W. Infections of the blood / G.W. Procop, D.L. Church, G.S. Hall, W.M. Janda, E.W. Koneman, P.C. Schreckenberger, G.L. Woods // In: *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology* / 7th edition. – Philadelphia, Wolters Kluwer, 2017. – 1610 p.

313. Rana, C. Gram negative bacteremia diagnosed on peripheral blood smear examination / C. Rana // *J Hematol*. – 2015. – Vol. 4(1). – P. 155–156.

314. Reddy, B.C. A study of prognosis and outcome of community acquired pneumonia in a tertiary care centre / B.C. Reddy, K.N. Preeti, C.M. Reddy // *Int J Current Microbiology and Applied Sciences*. – 2015. – Vol. 4(8). – P. 763–769.

315. Reddy, E.A. Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis / E.A. Reddy, A.V. Shaw, J.A. Crump // *Lancet Infect Dis*. – 2010. – Vol. 10(6). – P. 417–432.

316. Riedel, S. Blood cultures: key elements for best practices and future directions / S. Riedel, K.C. Carroll // *J Infect Chemother*. – 2010. – Vol. 16. – P. 301–316.

317. Robineau, O. Management and outcome of bloodstream infections: a prospective survey in 121 french hospitals (SPA-BACT survey) / O. Robineau, J. Robert, C. Rabaud, J-P. Bedos, E. Varon, Y. Pean, R. Gauzit, S. Alfordari // *Infection Drug Resistance*. – 2018. – Vol. 11. – P. 1359–1368.

318. Rodel, J. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for the rapid identification of bacteria and resistance determinants in positive blood cultures / J. Rodel, J.A. Bohnert, S. Stoll, L. Wassill, B. Edel, M. Karrasch, B. Loffler, W. Pfister // *Eur J*

Clin. Microbiol Infect Dis. – 2017. – Vol. 36(6). – P. 1033–1040.

319. Rojas-Moreno, C.H. Catheter-related bloodstream infections in patients on emergent hemodialysis / C.H. Rojas-Moreno, D. Spiegel, V. Valamanchili, E. Kuo, H. Quinones, P.V. Sreeramoju, J.P. Luby // Inf Control Hospital Epidem. – 2016. – Vol. 37(3). – P. 301–305.

320. Roth, A. Reducing blood culture contamination by a simple informational intervention / A. Roth, A.E. Wiklund, A.S. Palsson, E.Z. Melander, M. Wullt, J. Cronqvist, M. Walder, E. Sturegard // J Clin Microbiol. – 2010. – Vol. 48(2). – P. 4552–4558.

321. Royo-Cebrecos, C. A fresh look at polymicrobial bloodstream infection in cancer patients / C. Royo-Cebrecos, C. Gudiol, C. Ardanuy, H. Pomares, M. Calvo, J. Carratala // Plos One. – 2017. – Vol. 12(10). – P. e0185768.

322. Rutanga, J.P. Clinical significance of molecular diagnostic tools for bacterial bloodstream infections: a systematic review / J.P. Rutanga, T. Nyirahabimana // Interdiscip Perspect Infect Dis. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1–10.

323. Sagi, M. The Bactec FX blood culture system detects *Brucella melitensis* bacteremia in adult patients within the routine 1-week incubation period / M. Sagi, L. Neshet, P. Yagupsky // J Clin Microbiol. – 2017. – Vol. 55(3). – P. 942–946.

324. Salam, M.A. Peripheral blood buffy coat smear: a promising tool for diagnosis of visceral leishmaniasis / M.A. Salam, M.G. Khan, K.R. Bhaskar, M.H. Afrad, M.M. Huda, D. Mondal // J Clin Microbiol. – 2012. – Vol. 50(3). – P. 837–840.

325. Salimnia, H. Evaluation of the film array blood culture identification panel: results of a multicenter controlled trial / H. Salimnia, M.R. Fairfax, P.R. Lephart, P. Schreckenberger, S.M. DesJarlais, J.K. Johnson, G. Robinson, K.C. Carroll, A. Greer, M. Morgan, R. Chan, M. Loeffelholz, F. Valencia-Shelton, S. Jenkins, A.N. Schuetz, J.A. Daly, T. Barney, A. Hemmert, K.J. Kanack // J Clin Microbiol. – 2016. – Vol. 54(3). – P. 687–698.

326. Salvador, V.B.D. Clinical risk factors for infective endocarditis in *Staphylococcus aureus* bacteremia / V.B.D. Salvador, B. Chapagain, A. Joshi, D.J. Brennessel // Tex Heart Inst J. – 2017. – Vol. 44(1). – P. 10–15.



327. Salzer, H.J.F. Severe community-acquired bloodstream infection with *Acinetobacter ursingii* in person who injects drugs / H.J.F. Salzer, T. Rolling, S. Schmiedel, E-M. Klupp, C. Lange, H. Seifert // *Emerg Infect Dis.* – 2016. – Vol. 22(1). – P. 134–137.

328. Samuel, L.P. Evaluation of a microarray-based assay for rapid identification of gram-positive organisms and resistance markers in positive blood cultures / L.P. Samuel, R.J. Tibbetts, A. Agotesku, M. Fey, R. Hensley, F.A. Meier // *J Clin Microbiol.* – 2013. – Vol. 51(4). – P. 1188–1192.

329. Sato, A. Peripheral venous catheter-related bloodstream infection is associated with severe complications and potential death: a retrospective observational study / A. Sato, I. Nakamura, H. Fujita, A. Tsukimori, T. Kobayashi, S. Fukushima, T. Fujii, T. Matsumoto // *BMC Infect Dis.* – 2017. – Vol. 17. – P. 434–440.

330. Sato, R. A review of sepsis-induced cardiomyopathy / R. Sato, M. Nasu // *J Intensive Care.* – 2015. – Vol. 3. – P. 48–55.

331. Schmidt, V. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / V. Schmidt, A. Jarosch, P. März, C. Sander, V. Vacata, W. Kalka-Moll // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2012. – Vol. 31. – P. 311–317.

332. Schnell, D. Preliminary evaluation of a new clinical algorithm to interpret blood cultures growing coagulase-negative staphylococci / D. Schnell, H. Lecuyer, T. Geeraerts, A-S. Dumenil, E. Bille, F.J. Mercier, D. Benhamou, J-R. Zahar // *Scandinav J Infect Dis.* – 2013. – Vol. 45(7). – P. 562–566.

333. Seigel, T.A. Inadequacy of temperature and white blood cell count in predicting bacteremia in patients with suspected infection / T.A. Seigel, M.N. Cocchi, J. Saliccioli, N.I. Shapiro, M. Howell, A. Tang, M.W. Donnino // *J Emergency Medicine.* – 2012. – Vol. 42(3). – P. 254–259.

334. She, R.C. Performance of the BacT/Alert virtuo microbial detection system for the culture of sterile body fluids: prospective multicentre study / R.C. She, M.G. Romney, W. Jang, T. Walker, J.K. Karichu, S.S. Richter // *Clin Microbiol Infect.* – 2018. – Vol. 24(9). – P. 992–996.

335. Si, D. Characterising health care-associated bloodstream infections in public hospitals in Queensland, 2008-2012 / D. Si, N. Runnegar, J. Marquess, M. Rajmohan, E.G. Playford // *Med J Aust.* – 2016. – Vol. 204(7). – P. 276–283.

336. Singh, G. Quantitative buffy coat: a useful tool for diagnosis of Malaria / G. Singh, Raksha, A.D. Urhekar // *Int J Adv Microbiol Health Res.* – 2018. – Vol. 2(3). – P. 31–36.

337. Skogberg, K. Population-based burden of bloodstream infections in Finland / K. Skogberg, O. Lyytikainen, J. Ollgren, J.P. Nuorti, P. Ruutu // *Clin Microbiol Infect.* – 2012. – Vol. 18(6). – P. E170–E176.

338. Sogaard, K.K. Community-acquired and hospital-acquired respiratory tract infection and bloodstream infection in patients hospitalized with COVID-19 pneumonia / K.K. Sogaard, V. Baetting, M. Osthoff, S. Marsch, K. Leuzinger, M. Schweitzer, J. Meier, S. Bassetti, R. Bingisser, C.H. Nickel, N. Khanna, S. Tschudin-Sutte, M. Weisser, M. Battegay, H.H. Hirsch, H. Pargger, M. Siegemund, A. Egli // *J Intensive Care.* – 2021. – Vol. 9(1). – P. 1-10.

339. Sogaard, M. Changes in blood culture methodology have an impact on time trends of bacteraemia: a 26-year regional study / M. Sogaard, M.C. Engebjerg, S. Lundbye-Christensen, H.C. Schonheyder // *Epidemiol Infect.* – 2011. – Vol. 139. – P. 772–776.

340. Son, J.S. Bloodstream infections and clinical significance of healthcare-associated bacteremia: a multicenter surveillance study in Korean hospitals / J.S. Son, J-H. Song, K.S. Ko, J.S. Yeom, H.K. Ki, S-W. Kim, H-H. Chang, S.Y. Ryu, Y-S. Kim, S-I. Jung, S.Y. Shin, H.B. Oh, Y.S. Lee, D.R. Chung, N.Y. Lee, K.R. Peck // *J Korean Med Sci.* – 2010. – Vol. 25(7). – P. 992–998.

341. Spanu, T. Direct Maldi-Tof Mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida species* causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories / T. Spanu, B. Posteraro, B. Fiori, T. D'Inzeo, S. Campoli, A. Ruggeri, M. Tumbarello, G. Canu, E.M. Treccarichi, G. Parisi, M. Tronci, M. Sanguinetti, G. Fadda // *J Clin Microbiol.* – 2012. – Vol. 50(1). – P. 176–179.

342. Stevenson, L.G. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / L.G. Stevenson, S.K. Drake, P.R. Murray // *J Clin Microbiol.* – 2010. – Vol. 48. – P. 444–447.

343. Tai-Chia, Chiu. Recent advances in bacteria identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using nanomaterials as affinity probes / Chiu. Tai-Chia // *Intern J Molecular Sciences.* – 2014. – Vol. 15(5). – P. 7266–7280.

344. Takeshita, N. Unique characteristics of community-onset healthcare-associated bloodstream infections: a multi-centre prospective surveillance study of bloodstream infections in Japan / N. Takeshita, J. Kawamura, H. Kurai, H. Araoka, A. Yoneyama, T. Fujita, Y. Ainoda, R. Hase, N. Hosokawa, H. Shimanuki, N. Sekiya, N. Ohmagari // *J Hosp Infect.* – 2017. – Vol. 96(1). – P. 29–34.

345. Takihi, I.Y. Killers on the road: *Klebsiella* and *Pseudomonas* bacteremia detected on peripheral blood smear / I.Y. Takihi, A.F. Sandes // *Blood.* – 2013. – Vol. 122(11). – P. 1851.

346. Taniguchi, T. High positivity of blood cultures obtained within two hours after shaking chills / T. Taniguchi, S. Tsuha, S. Shiiki, M. Narita // *Intern J Infect Dis.* – 2018. – Vol. 76. – P. 23–28.

347. Taniguchi, T. Shaking chills and high body temperature predict bacteremia especially among elderly patients / T. Taniguchi, S. Tsuha, Y. Takayama, S. Shiiki // *Springer Plus.* – 2013. – Vol. 2. – P. 1–6.

348. Tay, E.Y. Clinical outcomes of bacteraemia in cellulitis of the leg / E.Y. Tay, T. Thirumorthy, S.M. Pang, H-Y. Lee // *Clin Exp Dermatol.* – 2014. – Vol. 39(6). – P. 683–688.

349. Thomson, P.C. Vascular access in haemodialysis patients: a modifiable risk factor bacteraemia and death / P.C. Thomson, C.M. Stirling, C.C. Geddes, S.T. Morris, R.A. Mactier // *QJM.* – 2007. – Vol. 100(7). – P. 415–422.

350. Tissari, P. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study / P. Tissari, A. Zumla, E. Tarkka, S. Mero, L. Savolainen, M. Vaara, A. Aittakorpi, S. Laakso,

M. Lindfors, H. Piiparinen, M. Maki, C. Carder, J. Huggett, V. Gant // *Lancet*. – 2010. – Vol. 375(9710). – P. 224–230.

351. Towns, M.L. Guidelines on blood cultures / M.L. Towns, W.R. Jarvis, P.R. Hsueh // *J Microbiol Immunol Infect*. – 2010. – Vol. 43(4). – P. 347–349.

352. Tsai, M-H. Polymicrobial bloodstream infection in neonates: microbiology, clinical characteristics, and risk factors / M-H. Tsai, S-M. Chu, J-F. Hsu, R. Lien, H.-R. Huang, M-C. Chiang, R-W. Lee, Y-C. Huang // *Plos One*. – 2014. – Vol. 9(1). – P. e83082.

353. Tuuminen, T. *Sarcina ventriculi* in blood: the first documented report since 1872 / T. Tuuminen, P. Suomala, S. Vuorinen // *BMC Infect Dis*. – 2013. – Vol. 13. – P. 169–172.

354. Valle, D.L.Jr. Evaluation of buffy coat 16S rRNA PCR, buffy coat culture and whole blood PCR for detection of bacteraemia / D.L.Jr. Valle, J.I. Andrade, E.C. Cabrera, W.L. Rivera // *Mem Inst Oswaldo Cruz*. – 2010. – Vol. 105(2). – P. 117–122.

355. Vena, A. Are incidence and epidemiology of anaerobic bacteremia really changing? / A. Vena, P. Munoz, L. Alcala, A. Fernandez-Cruz, C. Sanchez, M. Valerio, E Bouza // *Eur J Clin Microbiol. Infect Dis*. – 2015. – Vol. 34(8). – P. 1621–1629.

356. Venter, J.C. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea / J.C. Venter, K. Remington, J.F. Heidelberg, A.L. Halpern, D. Rusch, J.A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K.E. Nelson, W. Nelson, D.E. Fouts, S. Levy, A.H. Knap, M.W. Lomas, K. Neelson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y-H. Rogers, H.O. Smith // *Science*. – 2004. – Vol. 304(5667). – P. 66–74.

357. Verroken, A. Reducing time to identification of positive blood cultures with MALDI-TOF MS analysis after a 5-h subculture / A. Verroken, L. Defourny, L. Lechgar, A. Magnette, M. Delmee, Y. Glupczynski // *Eur J Clin Microbiol Inf Dis*. – 2015. – Vol. 34(2). – P. 405–413.

358. Vincent, J-L. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units / J-L. Vincent, J. Rello, J. Marshall, E. Silva, A. Anzueto, C.D. Martin, R. Moreno, J. Lipman, C. Gomersall, Y. Sakr, K. Reinhart // *JAMA*. – 2009. – Vol. 302(21). – P. 2323–2329.

359. Velasco, M. Blood cultures for women with uncomplicated acute pyelonephritis: Are they necessary? / M. Velasco, A. Martinez, A. Moreno-Martinez, J.P. Horcajada, J. Ruiz, M. Barranco, M. Almela, J. Vila, J. Mensa // *Clin Infect Dis.* – 2003. – Vol. 37. – P. 1127-1130.

360. Vossen, M.G. Gemella morbillorum bacteremia after anti-tumor necrosis factor alpha as acne inversa therapy / M.G. Vossen, K.B. Gattringer, N. Khalifeh, M. Koreny, V. Spertini, A. Mallouhi, M. Willeit, B. Volc-Platzer, F. Asboth, W. Graninger, F. Thalhammer, H. Lagler // *J Clin Microb.* – 2012. – Vol. 50(3). – P. 1109–1112.

361. WHO. Report on the burden of endemic health care-associated infection Worldwide. A systematic review of the literature World health Organization. – 2011. – 40 p.

362. Williamson, D.A. Population-based incidence and comparative demographics of community-associated and healthcare-associated *Escherichia coli* bloodstream infection in Auckland, New Zealand, 2005 – 2011 / D.A. Williamson, A. Lim, S. Wiles, S.A. Roberts, J.T. Freeman // *BMC Infect Dis.* – 2013. – Vol. 13. – P. 1–8.

363. Wirth, F. Epidemiology of *Rhodotorula*: An emerging pathogen / F. Wirth, L.Z. Goldani // *Interdiscip Perspect Infect Dis.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–7.

364. Wilson, J. Trends among pathogens reported as causing bacteraemia in England, 2004-2008 / J. Wilson, S. Elgohari, D.M. Livermore, B. Cookson, A. Johnson, T. Lamagni, A. Chronias, E. Sheridan // *Clin Microbiol Infect.* – 2011. – Vol. 17(3). – P. 451–58.

365. Wilson, M.L. Principles and procedures for blood cultures; approved guideline. CLSI document M-47 A / M.L. Wilson, M. Mitchell, A.J. Morris, P.R. Murray, L.G. Reimer, L.B. Reller, M. Towns, M.P. Weinstein, S.A. Wellstood, W.M. Dunne, R.C. Jerris, D.F. Welch // *Clin and Laboratory Standards Institute.* – 2007. – Vol. 27(17). – 67 p.

366. Wohoush, I.AI. Comparing clinical and microbiological methods for the diagnosis of true bacteraemia among patients with multiple blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci / I.AI. Wohoush, J. Rivera, J. Cairo, R. Hachem, I. Raad // *Clin Microb Infect.* – 2011. – Vol. 17(4). – P. 569–571.

367. Wolff, L. COVID-19–Associated *Fusobacterium nucleatum* bacteremia, Belgium / L. Wolff, D. Martiny, V.Y.M. Deyi, E. Maillart, P. Clevenbergh, N. Dauby // *Emerg Infect Dis.* – 2021. – Vol. 27(3). – P. 975-977.

368. Woyewoda, C.M. Bloodstream infection caused by nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in an immunocompromised host in the United States / C.M. Woyewoda, C.E. Koval, D.A. Wilson, M.H. Chakos, S.M. Harrington // *J Clin Microbiol.* – 2012. – Vol. 50(6). – P. 2170–2172.

369. Yahav, D. Bloodstream infections in older patients / D. Yahav, N. Eliakim-Raz, L. Leibovici, M. Paul // *Virulence.* – 2016. – Vol. 7(3). – P. 341–352.

370. Yan, J. The association between arrhythmia and *Helicobacter pylori* infection: A meta-analysis of case-control studies / J. Yan, Q. She, Y. Zhang, C. Cui, G. Zhang // *Int J Environ Res Public Health.* – 2016. – Vol. 13(11). – P. 1139–1150.

371. Yang, K.Y. *Corynebacterium urealyticum* bacteremia in a hemodialysis patient with perm catheter infection / K.Y. Yang, Y.C. Yeh, C.C. Wu, C.C. Wang, C.Y. Liao // *Biomed J Scientific Technical Research.* – 2018. – Vol. 9(1). – P. 6839–6841.

372. Year, H. Polymicrobial candidaemia revealed by peripheral blood smear and chromogenic medium / H. Year, D. Poulain, A. Lefebvre, D. Camus, B. Sendid // *J Clin Pathol.* – 2004. – Vol. 57. – P. 196–198.

373. Zarei, O. A simple and rapid protocol for producing yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* suitable for preparing bacterial culture media / O. Zarei, S. Dastmalchi, M. Hamzeh-Mivehroud // *Iran J Pharm Res.* – 2016. – Vol. 15(4). – P. 907–913.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1

## Карта целевого сбора анамнеза госпитального больного

КАРТА ИССЛЕДОВАНИЯ БОЛЬНОГО		
Анамнестические данные	Клинико-лабораторические данные	Бактериологические данные
№ наблюдения _____	Дата госпитал. _____	Мазки крови: по Граму _____
Ф.И.О. _____	Кол-во эритроцитов _____	в Лям. _____
возраст _____	- " - лейкоцитов _____	Время забора крови _____ <i>t° =</i>
№ и/б _____	- " - нейтрофилов _____	антибиотик _____ рост _____ срок _____
Диагноз при поступлении _____	- " - лимфоцитов _____	Мазок флакона _____
	- " - тромбоцитов _____	Срок посева из флакона _____
Заключительный клинический диагноз _____	СОЭ _____ ВРП _____ ИК _____	Вид субкультурирования _____
	свертываемость _____	Выделенный м/о из крови _____
	длит. кровотечения _____	монокультура _____
	М/Т _____ <i>d<sub>2</sub></i> _____ <i>γ</i> _____	ассоциация _____
Причина направления на исследование _____	АСЛ "О" _____ АСК _____	Чувствительность к антибиотикам: <u>высокочувствителен</u>
	СРБ _____ РБ _____	слабочувствителен _____
Наличие очагов инфекции _____	Терапевтические данные	нечувствителен _____
	терапия до начала исследования _____	
Лихорадка: хар-р _____ длит. _____	вид антибиотика _____	
Озноб _____ потливость _____	курс _____	
Состояние больного _____	др. препараты _____	
снижение веса _____		

## Карта целевого сбора анамнеза внегоспитального пациента

**Карта**  
профилактического обследования пациента

" \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 199\_\_ г. хирург \_\_\_\_\_ № \_\_\_\_\_

Ф.И.О. \_\_\_\_\_

19\_\_ г., ж и , докт. \_\_\_\_\_

Жалобы: \_\_\_\_\_

---

1. Инфекция  есть  нет

2. Озноб  есть  нет

3. Заболевания полости рта  есть  нет

4. Манипуляции в р-те полости \_\_\_\_\_

---

5. Гастрит  есть  нет, колит  есть  нет, язвенная болезнь жел-ка  
панкреатит  есть  нет, гастрит 12-ч.к-ки  есть  нет

6. Стул \_\_\_\_\_ раз в день оформленный,  и/жидкий,  жидкий  
запор  есть  нет

7. Гайморит  есть  нет, частые ангины  есть  нет, хронический  есть  нет

8. Бронхит  есть  нет, пневмония  есть  нет

9. Кровяное давление \_\_\_\_\_, ревматизм  есть  нет  
врожденные пороки сердца  есть  нет

10. Пиелонефрит  есть  нет, цистит  есть  нет, гломерулонефрит  есть  нет  
заболевания почек  есть  нет

11. Гипекологический статус \_\_\_\_\_  
Б \_\_\_\_\_, Р \_\_\_\_\_, А \_\_\_\_\_

12. Боли в мышцах  есть  нет, суставах  есть  нет

13. Удары, ушибы, травмы, падения, укусы животных  есть  нет

14. Наличие на коже прыщей, фурункулов  есть  нет

15. Медицинские манипуляции: \_\_\_\_\_

---

16. Перенесенные заболевания: гепатит  есть  нет, туберкулез  есть  нет  
аллергия  есть  нет, вен.заболевания \_\_\_\_\_ *филофарф*

17. Диатез в детстве  есть  нет

18. Подверженность гриппу, ОРЗ: \_\_\_\_\_  
*Виды и результаты:*

19. Сахарный диабет  есть  нет

20. Заболевания щитовидной железы  есть  нет

21. Состояние лимфоузлов  увеличены,  в норме

22. Курит  есть  нет

23. Заключение и рекомендации врача: \_\_\_\_\_

---

врач \_\_\_\_\_