

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Каргальцева Н. М.¹, Кочеровец В. И.², Миронов А. Ю.¹, Борисова О. Ю.¹

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ГЕМОКУЛЬТУРЫ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИИ КРОВОТОКА

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава РФ», 119991, Москва, Россия

Диагностика инфекции кровотока (ИК) актуальна для амбулаторных пациентов. Для получения положительной гемокультуры необходим большой объем крови (CLSI): 2 сета, 40 мл крови для диагностики 95% бактериемий. Молекулярно-генетический метод не может заменить культуральный, хотя ускоряет идентификацию патогена. Культуромика – методология, состоящая из разных условий для выделения микробов из пробы и их молекулярно-генетической идентификации. Использован запатентованный метод прямого посева лейкоцитарного слоя из 4,5 мл пробы венозной крови и метод идентификации MALDI-ToF MS. Из 382 обследованных амбулаторных пациентов гемокультура получена от 183 (48,0%), чаще у женщин (65,6%), у молодых людей (74,9%). Возбудители внебольничной ИК относятся к аэробам (73,4%), анаэробам (24,2%), грибам (2,4%). Преобладают грамположительные кокки (51,4%), редко выделяются грамотрицательные палочки (9,6%). ИК – моноинфекция в 66,5% и смешанная в 33,5%. Ассоциации состоят из 2, 3, 4 патогенов в одной пробе крови (75,4%, 18,8%, 5,8%, соответственно), ассоциация разных видов аэробов составляет 47,8%, ассоциация аэробов и анаэробов – 42,0%. ИК вызывает осложнения основного заболевания органов дыхания, мочеполовой системы, в 100% случаев развивается после пластической хирургии. Для посева лейкоцитарного слоя требуется малый объем крови, прямой посев на агар сокращает срок выдачи ответа до 2-х дней, позволяет проводить генетическую идентификацию патогена на 2-й день от момента взятия крови.

Ключевые слова: инфекция кровотока; амбулаторные больные; лейкоцитарный слой.

Для цитирования: Каргальцева Н. М., Кочеровец В. И., Миронов А. Ю., Борисова О. Ю. Метод получения гемокультуры при диагностике инфекции кровотока. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (3): 185-190.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-3-185-190>

Kargaltseva N. M.¹, Kocherovets V. I.², Mironov A. Yu.¹, Borisova O. Yu.¹

METHOD FOR OBTAINING BLOOD CULTURE WHILE DIAGNOSING BLOODSTREAM INFECTION

¹G. N. Gabriчевskii Moscow research institute of epidemiology and microbiology for Rosпотребнадзор, 125212, Moscow, Russia;

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, 119991, Moscow, Russia

Diagnosing of bloodstream infection (BSI) in outpatients is essential. A large blood volume is required to obtain blood culture (CLSI): 2 sets, 40ml of blood for diagnosing in 95% cases of bacteremia. Molecular–genetic methods can not replace blood culture method, but they accelerate the identification of any pathogen. Culturomics gives a combination of different conditions for isolating microorganisms from a sample and along with their genetic identification.

We used the patent method for direct inoculation of buffy-coat from 4,5ml of a venous blood sample and MALDI-ToF identification method. In 382 outpatients examined there were received 183 blood cultures (48,0%), more often among women (65,6%) and young people (74,9%). The causative agents of community-acquired bloodstream infection were aerobes (73,4%), anaerobes (24,2%), fungi (2,4%). The gram-positive cocci were prevailing (51,4%) and the gram-negative rods were isolated rather seldom (9,6%). BSI was monomicrobial (66,5%) and polymicrobial (33,5%). Polymicrobial blood cultures had 2, 3, 4 agents in one blood sample (75,4%, 18,8%, 5,8%, respectively). There were also found combinations of different species of aerobes (47,8%), aerobes with anaerobes (42%). BSI caused complications of the primary disease of the respiratory system, urogenital system and in 100% of cases after plastic surgery. A small blood volume is required for buffy-coat inoculation, the direct agar culture reduces the response time to 2 days, so it makes genetic identification possible on the 2nd day from the moment of blood collection.

Key words: bloodstream infection; outpatients; buffy-coat.

For citation: Kargaltseva N.M., Kocherovets V.I., Mironov A.Yu., Borisova O.Yu. Method for obtaining blood culture while diagnosing bloodstream infection. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (3): 185-190. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-3-185-190>

For correspondence: Kargaltseva N. M.; e-mail: kargaltseva@mail.ru

Information about authors:

Kargaltseva N. M., <http://orcid.org/0000-0002-3245-5486>

Kocherovets V. I., <http://orcid.org/0000-0001-7720-670X>

Mironov A. Yu., <http://orcid.org/0000-0002-8544-523>

Borisova O. Yu., <http://orcid.org/0000-0001-6316-5046>

Conflict of interest. The authors declare absence of conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 11.12.2019
Accepted 15.12.2019

Введение. Выделение гемокультуры при диагностике инфекции кровотока (ИК) не потеряло своей актуальности [1]. Эта проблема остро стоит у амбулаторных пациентов. Внебольничная ИК возникает у амбулаторных пациентов по причине хронических коморбидных состояний, коинфекций, экономических факторов. Всё это является факторами риска развития внебольничной ИК. Инфекционные осложнения у амбулаторных пациентов играют ключевую роль при различных заболеваниях, этиологическая диагностика ИК активно проводится за рубежом [2-6]. Выделение и идентификация циркулирующих в кровотоке микроорганизмов при ИК является одним из важнейших направлений работы лаборатории клинической микробиологии [7].

Для получения гемокультуры отбирают определённое количество проб крови до начала антимикробной терапии, используют культуральную систему (ручная или автоматизированная), соответствующую атмосферу, время инкубации, субкультивирование, тесты для идентификации [8]. В данном алгоритме важным принципом является объём исследуемой крови [9-14]. При расчёте оптимального объёма крови учитывают низкий уровень циркулирующих микроорганизмов у взрослых при ИК, который меньше 10 КОЕ/мл, иногда меньше 1 КОЕ/мл и в 20% случаев – менее 0,1 КОЕ/мл [15]. Рост микроорганизмов увеличивается на 3% с каждым добавленным 1 мл крови [9]. Описано получение роста в первом посеве в 80%, во втором – 88%, в третьем – 99% случаев при посевах в три флакона по 20 мл крови [16]. Аналогичные результаты получены при посевах по 15 мл крови в два аэробных и один анаэробный флаконы с питательной средой [17]. В первых трёх посевах получен рост в 95,7% случаев [11]. Эти данные положены в основу рекомендаций, предлагающие исследовать 2-3 последовательных образца крови в течение 24 часов [18]. С увеличением объёма исследуемой крови увеличивается и количество положительных гемокультур [9,19]. Это справедливо и для автоматизированных систем, увеличение количества флаконов [10]. Уровень выявления патогенов при использовании автоматизированных гемокультуральных систем вынуждает моделировать систему. Руководство CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) предписывает использовать 2 сета, т.е. 4 флакона по 10 мл крови в каждый для определения 90-95% бактериемий. При использовании дополнительного 3-го сета эффективность диагностики должна повыситься до 95-99% случаев [5,18].

С приходом в микробиологическую лабораторию автоматизации, интеграции геномики и протеомики положительный результат стал более зависеть от качества взятого образца [20]. Это положение относится и к автоматизированным системам.

Выделение чистой культуры микроорганизмов требует большого объёма работы и времени, поэтому совершенствование лабораторной диагностики привело к внедрению молекулярно-генетических методов. Метагеномные исследования показали возможность замены культурального метода, но многочисленные работы опровергли это положение, поскольку выделение чистой культуры и определение её чувствительности к антимикробным препаратам молекулярно-генетические методы не могут решить. Молекулярно-генетическая детекция микроорганизма в крови не требует инкубации крови, может выполняться на фоне антимикробной терапии, детектировать прихотливые и некультивируемые

микроорганизмы, использовать малый объём крови для анализа (1,0-1,5 мл) [21,22]. Молекулярно-генетические методы должны входить в арсенал методов лабораторной диагностики ИК [22]. Определены ограничения для молекулярно-генетических методов. К ним отнесены: высокая бактериальная нагрузка, превышающая лимитное определение для ПЦР; большое количество ДНК пациента, которые «мешают» праймерам при постановке ПЦР; способность крови ингибировать ПЦР. Проба крови не должна содержать антикоагулянт – гепарин, поскольку он ингибирует ПЦР. Существует риск контаминации образца и получения ложноположительных результатов, в связи с чем следует дифференцировать ДНК-емью от истинной бактериемии. При антимикробной терапии ДНК патогенов циркулируют в крови несколько суток. На этом основании сформулировали вывод о неспособности молекулярно-генетического метода заменить культуральное исследование крови [23,24].

Культуральный метод оптимизируют, изменяя различные его параметры и условия. Данная технология получила название культуромики. В её смысл вложен новый подход в стратегии выделения микроорганизма, идентификация методом MALDI-TOF MS, определение новых видов микроорганизмов, не входящих в базу MALDI-TOF, путём секвенирования 16S рибосомальных РНК [25]. Первоначально работа выполнена при культуральном исследовании кала с целью апробации разных условий для повышения эффективности выделения известных микроорганизмов и ранее не выделяемых [25]. Увеличение вариантов культивирования при исследовании кала позволило расширить спектр микроорганизмов и идентифицировать новые виды [25]. С применением новых протоколов исследования получено 531 дополнительных вида к спектру известных микроорганизмов в кале человека, включая 146 описанных у людей, 187 бактерий и 1 архею, которые ранее не выделялись из кала человека и 197 новых видов [25]. Используя приемы культуромики и MALDI-TOF MS, выделен штамм *Rothia mucilaginosa*, не выделявшийся ранее из крови в РФ [26]. Для повышения эффективности выделения гемокультур нами взяты за основу принципы гемокультуривирования и культуромики. Опробирован запатентованный метод прямого посева лейкоцитарного слоя пробы периферической крови [27], обеспечивающий рост всех живых микроорганизмов, находящихся в данной пробе крови. Микроорганизмы концентрируются в лейкоцитарном слое из-за фагоцитоза и склеивания тромбоцитами. Качественная характеристика лейкоцитарного слоя, механизм распределения клеток крови и микроорганизмов описаны в 1945 г. [28].

Цель работы – опробировать простой и эффективный метод получения гемокультур при диагностике ИК у амбулаторных пациентов.

Материал и методы. Материал для исследования – кровь терапевтических пациентов, находившихся на амбулаторном обследовании по поводу различных нозологических форм заболевания в ЛПУ Москвы и Санкт-Петербурга. Обработка кожи и транспортировка пробы крови проводились согласно МУК 4.2.2039-05*. Внебольничную ИК изучали у 183 пациентов с ИК из 382 амбулаторных пациентов с хроническими заболеваниями систем организма и коморбидными состояниями.

*МУК 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортировки биоматериалов в микробиологические лаборатории».

Использован запатентованный метод [27]. Материалом для культивирования служил лейкоцитарный слой крови. Для получения лейкоцитарного слоя пробу крови в объёме 4,5 мл отбирали в стерильную одноразовую закрытую систему, содержащую 0,5 мл цитрата натрия, представляющую шприц, который после взятия крови, трансформировался в пробирку, легко транспортируемую в лабораторию. В лаборатории после центрифугирования (1000 об/мин в течение 15-20 мин) средний тонкий белый лейкоцитарный слой представлял кон-

центрат всех микроорганизмов, находящихся в данной пробе крови. Одноразовыми пипетками капли слоя инокулировались на поверхность двух высокопитательных плотных сред (аэробный и анаэробный агары) и культивировались в соответствующих газовых атмосферах.

Согласно определению экологического словаря индекс встречаемости – число обнаруженного агента, выраженное в процентах к общему числу проб. Индекс относится к цифровому показателю и применяется в медицинских исследованиях [29].

Таблица 1

Спектр возбудителей внебольничной инфекции кровотока

Микроорганизмы	Количество штаммов (n=297)		Индекс встречаемости С, % (n=206)
	абс.	%	
Аэробные микроорганизмы	218	73,4	105,8
Грамположительные кокки:	144	48,5	70,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	4,4	6,3
<i>S. epidermidis</i>	77	25,9	37,4
<i>S. haemolyticus</i>	6	2,0	2,9
<i>S. hominis</i>	4	1,3	1,9
<i>S. lugdunensis</i>	1	0,3	0,5
<i>S. saprophyticus</i>	5	1,7	2,4
<i>S. sciuri</i>	1	0,3	0,5
<i>S. warneri</i>	1	0,3	0,5
<i>S. xylosus</i>	1	0,3	0,5
<i>S. capitis</i>	1	0,3	0,5
<i>S. auricularis</i>	1	0,3	0,5
<i>Micrococcus luteus</i>	3	1,3	1,9
<i>Sarcina spp.</i>	1	0,3	0,5
<i>Rothia mucilaginosa</i>	1	0,3	0,5
<i>Streptococcus 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>Enterococcus faecalis</i>	4	1,3	1,9
<i>E. faecium</i>	4	1,3	1,9
<i>E. raffinosus</i>	1	0,3	0,5
Грамположительные палочки:	39	13,1	18,9
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	8	2,7	3,9
<i>C. bovis</i>	4	1,3	1,9
<i>C. minutissimum</i>	4	1,3	1,9
<i>C. pseudotuberculosis</i>	2	0,7	1,0
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	1	0,3	0,5
<i>C. xerosis</i>	1	0,3	0,5
<i>C. jeikeium</i>	1	0,4	0,5
<i>Corynebacterium spp.</i>	8	2,7	3,9
<i>p. Kurthia</i>	1	0,3	0,5
<i>Tsukamurella paurometabola</i> *****	1	0,3	0,5
грам(+) аэробная	1	0,3	0,5

Микроорганизмы	Количество штаммов (n=297)		Индекс встречаемости С, % (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>Brevibacillus bostelensis</i>	1	0,3	0,5
Грамположительные бактерии:	2	0,7	1,0
<i>Bacillus cereus</i>	1	0,3	0,5
<i>B. subtilis</i>	1	0,3	0,5
Грамотрицательные кокки:	6	2,0	2,9
<i>Neisseria flava</i>	1	0,3	0,5
<i>Branhamella catarrhalis</i> ***	1	0,3	0,5
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	4	1,3	1,9
Грамотрицательные палочки:	27	9,1	13,1
<i>Escherichia coli</i>	1	0,3	0,5
<i>Klebsiella aerogenes</i> **	4	1,3	1,9
<i>Serratia marcescens</i>	2	0,7	1,0
<i>S. liquefaciens</i>	4	1,3	1,9
<i>S. marinorubra</i> *	2	0,7	1,0
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0,7	1,0
<i>Pseudomonas 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>Alcaligenes faecalis</i>	2	0,7	1,0
Анаэробные микроорганизмы	72	24,2	35,0
Грамположительные кокки:	5	1,7	2,4
<i>Peptococcus spp.</i>	5	1,7	2,4
Грамположительные палочки:	66	22,2	32,0
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2	0,7	1,0
<i>Cutibacterium acnes</i> *****	64	21,5	31,1
<i>Клостридии</i>	0	0,0	0,0
Грамотрицательные палочки:	1	0,3	0,5
<i>Fusobacterium spp.</i>	1	0,3	0,5
Грамотрицательные кокки:	0	0,0	0,0
Грибы:	7	2,3	3,4
<i>Candida albicans</i>	2	0,7	1,0
<i>Rhodotorula spp.</i>	2	0,7	1,0
<i>Aspergillus niger</i>	3	1,0	1,5

Примечание. * – *Serratia marinorubra* (до 1980 г. *Serratia rubidaea*); ** – *Klebsiella aerogenes* (до 2017 г. *K. mobilis*); *** – *Branhamella catarrhalis* (до 1980 г. *Moraxella catarrhalis*); **** – *Burkholderia cepacia* (до 1993 г. *Pseudomonas cepacia*); ***** – *Tsukamurella paurometabola* (до 1988 г. *Corynebacterium paurometabolum*); ***** – *Cutibacterium acnes* (до 2016 г. *Propionibacterium acnes*).

Статистическая обработка данных, полученных при исследовании, выполнена с помощью пакета программ для статистического анализа Statistica 10. При сравнительном анализе качественных показателей в изучаемых группах использовался критерий χ^2 (хи-квадрат) или (при его неустойчивости) точный критерий Фишера.

Результаты. ИК диагностирована у 183 (48,0%) из 382 обследованных терапевтических амбулаторных пациентов. Гемокультура получена в 206 (42,8%) из 481 проб крови. Внебольничная ИК чаще развивалась у женщин, чем у мужчин (65,6% и 34,4%, соответственно, $p < 0,001$) и у лиц молодого возраста (74,9%). Из полученных 206 гемокультур выделено 297 штаммов микроорганизмов.

Ведущие возбудители внебольничной ИК относились к аэробным (73,4%), анаэробным бактериям (24,2%), грибам (2,4%). Из общего числа выделенных возбудителей бактерии составляли большинство по отношению к грибам (97,7% и 2,3%, соответственно, $p < 0,001$). Среди бактерий преобладали грамположительные кокки (51,4%) и грамположительные палочки (36,9%). Доля грамотрицательных палочек составляла 9,6%. Грибы рода *Candida* выделяли из крови в 1,7 раза чаще, чем плесневые (71,4% и 42%, соответственно). Среди аэробов ведущими возбудителями ИК являлись грамположительные кокки (66,1%), среди анаэробов – неспорообразующие грамположительные палочки (91,7%). Аэробные грамотрицательные палочки чаще высевались из крови, чем анаэробные (12,3% и 1,4% соответственно, $p = 0,0046$).

Выделенные 297 штаммов микроорганизмов относились к 32 родам и 48 видам (табл. 1). Группу аэробных бактерий составляли грамположительные кокки (48,5%), неспорообразующие палочки (13,1%), бациллы (0,7%), грамотрицательные коккобактерии (2%), грамотрицательные палочки (9,1%). Среди грамположительных

кокков преобладали: *Staphylococcus epidermidis* (25,8%), *S. aureus* (4,4%), *S. haemolyticus* (2%), *Streptococcus mitis* (4,7%). Среди неспорообразующих грамположительных палочек лидировала *Corynebacterium ulcerans* (2,7%). Среди грамотрицательных палочек чаще выделяли *Burkholderia cepacia* (1,7%). Среди анаэробов преобладала *Cutibacterium acnes* (21,5%). Дрожжевые и плесневые грибы выделялись в следовом количестве.

Индекс встречаемости микроорганизмов, как дополнительный интегральный показатель, способен определить какие микроорганизмы ожидаются в случае появления клинических симптомов ИК. Индекс встречаемости выделенных в гемокультуре микроорганизмов показал преобладание аэробов над анаэробами (105,8 и 35%, соответственно). Среди аэробных бактерий преобладали грамположительные кокки над грамотрицательными палочками (70 и 13,1%, соответственно). Роль *Staphylococcus epidermidis* и *Cutibacterium acnes* при ИК сегодня обсуждается. Известна этиологическая роль условно-патогенных микроорганизмов в ИК при коморбидных и хронических заболеваниях.

Внебольничная ИК чаще являлась моноинфекцией, реже смешанной инфекцией (66,5% и 33,5%, соответственно, $p < 0,001$), что затрудняло диагностику, усложняло оценку этиологической роли каждого патогена и подбор антимикробной терапии. Смешанные гемокультуры характеризовались наличием двух, трёх, четырёх микроорганизмов в одной пробе крови (75,4, 18,8, 5,8%, соответственно). В полимикробных гемокультурах встречались ассоциации разных видов аэробных бактерий (47,8%), аэробов и анаэробов (42%), бактерий и грибов (7,2%).

Внебольничная ИК чаще осложняла течение основного заболевания при патологии органов дыхания и мочеполовой системы (6%), в 100% случаев после контурной пластики в пластической хирургии (табл. 2).

Таблица 2

Гемокультуры от пациентов с соматической патологией и внебольничной ИК

Патология	Внебольничная ИК											Количество штаммов		
	Всего больных	Больные с ИК			Всего анализов	Гемокультура			Полимикробная гемокультура					
		абс.	% или доля	95% ДИ		абс.	% или доля	95% ДИ	абс.	% или доля	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ
Системы 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 системы	10	6	60,0	31,3-83,2	7	6	6/7	–	2	2/6	–	10	3,4	1,8-6,1
костно-мышечной системы	8	1	1/8	–	3	1	1/3	–	0	0/1	–	1	0,3	0,1-1,9
Органов пищеварения	10		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 генеза	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	

Примечание. При $n \leq 10$ относительный показатель представлен простой дробью, в числителе приведено абсолютное значение, в знаменателе – объём группы.

Заболевания кожи и подкожной клетчатки, полости рта осложнялись ИК в 47,5 и 57,8%, соответственно. Полимикробность ИК характерна при заболеваниях органов пищеварения (66,7%), кожи и подкожной клетчатки (36,3%), мочеполовой системы (33,3%), лихорадке (36,5%).

Обсуждение. Внебольничная ИК амбулаторных пациентов диагностировалась при исследовании лейкоцитарного слоя (buffy-coat), представлявшего собой концентрат микроорганизмов в минимальном объеме взятой крови (4,5 мл), в аэробных и анаэробных условиях инкубирования посевов на высокопитательном агаре, что позволило повысить эффективность выделения гемокультур. Бактериологические лаборатории России работают по приказу № 535 Минздрава СССР 1985 г. При анализе опубликованных результатов выделения гемокультур от пациентов стационара по приказу № 535 и на автоматизированных гемокультуральных системах, установлено, что средний показатель получения гемокультур по протоколу приказа № 535 составляет 11,5% [30-32], на автоматизированных баканализаторах крови – 11,3% [33-36]. Известно использование импортных бактериологических анализаторов крови [37], но они не обеспечивают прогресса в выделении гемокультур. На основе приемов культуromики применен эффективный метод получения гемокультур, при котором посевным материалом служил лейкоцитарный слой пробы периферической крови. Согласно рекомендациям культуromики использованы изменения в гемокультуривировании на всем протяжении исследования крови. Классический метод гемокультуривирования рекомендует первоначальное взятие 40-60 мл крови. Предлагаемый метод является щадящим для пациента (4,5 мл крови). Применение прямого посева лейкоцитарного слоя на высокопитательный аэробный и анаэробный кровяной агары в чашки Петри позволяет экономить на дорогостоящих импортных флаконах автоматизированных гемсистем и ускорять получение результата. Полученный рост колоний на следующий день идентифицируется молекулярно-генетическим методом (MALDI-TOF MS) и выдается ответ на следующий день от момента взятия крови. Как результат примененного метода, положительные гемокультуры получены в 48% случаев при внебольничной ИК, которая регистрировалась больше у женщин и у лиц молодого возраста. По индексу встречаемости чаще выделялись аэробные бактерии и реже – анаэробные, в единичных случаях – грибы. Среди бактерий преобладали грамположительные кокки. Приоритетными патогенами являлись *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus mitis*, *Cutibacterium acnes*. Для внебольничной ИК характерны полимикробность гемокультур в 33,5% случаев и до четырёх число ассоциантов. ИК осложняет заболевания при патологии органов дыхания, мочеполовой системы, кожи и подкожной клетчатки, полости рта, в 100% случаев – после контурной пластики в пластической хирургии.

Заключение. Методология культуromики дала широкие возможности для модернизации техники микробиологического исследования крови. Условия культуromики применены для культивирования крови амбулаторных пациентов. Не требуются флаконы с питательной средой, не проводится субкультивирование. По экономическим и временным затратам метод более выгоден. Данный метод выделения гемокультур оптимален в лабораториях любого уровня оснащения. Получение гемокультуры описан-

ном методом демонстрирует его высокую эффективность и простоту использования. Молекулярно-генетический метод дополняет культуральный, помогает решить проблемы идентификации, и в итоге, повышает эффективность лабораторной диагностики ИК.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-25, 28 см. REFERENCES)

- Борисова О.Ю., Алёшкин В.А., Каргальцева Н.М., Кочеровец В.И., Пастушенков В.Л., Карпова Е.И. и др. Первый случай выделения в России *Rothia mucilaginosa* из крови пациентки с осложнением после контурной пластики. *Медицинский альманах*. 2015; 5(40): 93-6.
- Каргальцева Н.М. Способ диагностики бактериемий. Патент РФ № 2098486; 1997.
- Самарцев В.А., Еньчева Ю.А., Кузнецова М.В., Карпунина Т.И. Особенности инфицирования ожоговых ран. *Новости хирургии*. 2014; 22(2): 199-206.
- Грувер К.П., Жуховицкий В.Г., Белобородов В.Б. Клинико-эпидемиологические особенности бактериемии. *Инфекционные болезни*. 2010; 8(4): 13-8.
- Чеботкевич В.Н., Бессмельцев С.С., Киселева Е.Е., Стижак Н.П., Кайтанджан Е.И., Бурылев В.В. Клинико-микробиологическая характеристика инфекций кровотока у онкогематологических больных. *Онкогематология*. 2016; 11(3): 58-67.
- Татульян А.А., Кондратьева Е.И., Клещенко Е.И., Трёмбач А.В. Анализ выявленных бактериемий у пациентов с онкогематологической патологией в многопрофильном детском стационаре Краснодара. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2016; 3(45): 68-73.
- Честнова Т.В., Серегина Н.В., Дешко И.В. Сравнительный анализ микробного пейзажа возбудителей, выделенных из крови лихорадящих больных. *Вестник новых медицинских технологий*. 2012; 19(2): 63-5.
- Багирова Н.С. Таксономическая структура и резистентность к антибиотикам возбудителей инфекций кровотока у онкогематологических больных. *Клиническая онкогематология*. 2015; 8(2): 191-200.
- Арефьева Л.И., Горская Е.М., Савостьянова О.А., Спирина Т.С., Ромашкина Л.Ю., Габриэлян И.И. Послеоперационные бактериемии у пациентов кардиохирургического профиля. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 20(5): 19-23.
- Гусаров В.Г., Карпов О.Э., Дементенко М.В., Нестерова Е.Е., Лашенкова Н.Н., Замятин М.Н. Изменение этиологической структуры и клинических исходов бактериемий у хирургических больных как результат мониторинга и управления антибиотикорезистентностью в многопрофильном стационаре. *Медицинский вестник Юга России*. 2017; 8(1): 51-9.
- Учение об инфекции. Воробьев А.А., ред. М.: Русский врач; 2000.

REFERENCES

- Opota O., Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015; 21: 313-22.
- Deen J., von Seidlein L., Andersen F., Elle N., White N., Lubell Y. Community-acquired bacterial bloodstream infections in developing countries in south and southeast Asia: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 2012; 12(6): 480-7.
- Laupland K.B., Kibsey P.C., Gregson D.B., Galbraith J.C. Population-based laboratory assessment of the burden of community-onset bloodstream infection in Victoria, Canada. *Epidemiol. Infect.* 2013; 141: 174-80.
- Kanoksil M., Jatapai A., Peacock S.J. Epidemiology, Microbiology and Mortality Associated with Community-Acquired Bacteremia in Northeast Thailand: A Multicenter Surveillance Study. *Plos One*. 2013; 8 (1): e54714.

5. Laupland K.B., Church D.L. Population-Based Epidemiology and Microbiology of Community-Onset Bloodstream Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27(4): 647-64.
6. Laupland K.B., Gregson D.B., Flemons W.W., Hawkins D., Ross T., Church D.L. Burden of community-onset bloodstream infection: a population-based assessment. *Epidemiol. Infect.* 2007; 135(6): 1037-42.
7. Kirn T.J., Weinstein M.P. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013; 19: 513-20.
8. Wilson M.L., Weinstein M.P. General principles in the laboratory detection of bacteremia and fungemia. *Clinics in Laboratory Medicine.* 1994; 14(1): 69-82.
9. Mermel L.A., Maki D.G. Detection of bacteremia in adults: consequences of culturing an inadequate volume of blood. *Ann. Intern. Med.* 1993; 119: 270-2.
10. Lin H-H., Liu Y-F., Tien N., Ho C-M., Hsu L-N., Lu J-J. Evaluation of the blood volume effect on the diagnosis of bacteremia in automated blood culturesystems. *J. Microb. Immunol. Infect.* 2013; 46: 48-52.
11. Cockerill F.R. III, Wilson J.W., Vetter E.A., Goodman K.M., Torgerson C.A., Harmsen W.S. et al. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38(15): 1724-30.
12. Lee A., Mirrett S., Reller L.B., Weinstein M.P. Detection of bloodstream infections in adults: how many blood cultures are needed? *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(11): 3546-8.
13. Patel R., Vetter E.A., Harmsen W.S., Schleck C.D., Fadel H.J., Cockerill F.R. III. Optimized pathogen detection with 30- compared to 20-milliliter blood culture draws. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(12): 4047-51.
14. Ombelet S., Barbe B., Affolabi D., Ronat J-B., Lompo P., Lunguya O. et al. Best practices of blood cultures in low-and middle-income countries. *Front. Med.* 2019; 6, article 131: 1-27.
15. Yagupsky P., Nolte F.S. Quantitative aspects of septicemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990; 3(3): 269-79.
16. Washington J.A. Blood cultures: principles and techniques. *2nd Mayo Clin. Proc.* 1975; 50(2): 91-8.
17. Weinstein M.P., Reller L.B., Murphy J.R., Lichtenstein K.A. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. *Rev. Infect. Dis.* 1983; 5: 35-53.
18. CLSI. Principles and procedures for blood cultures; approved guideline. In CLSI document M47-A; *Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA.* 2007; 27(17): 51.
19. Ilstrup D.M., Washington J.A. The importance of volume of blood cultured in the detection of bacteremia and fungemia. *Diagnostic Microb. and Infect. Dis.* 1983; 1(2): 107-10.
20. Baron E.J., Miller J.M., Weinstein M.P., Richter S.S., Gilligan P.H., Jr T.R.B. et al. 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). *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57(4): e22-121.
21. Tissari P., Zumla A., Tarkka E., Mero S., Savolainen L., Vaara M. et al. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *Lancet.* 2010; 375: 224-30.
22. Peker N., Couto N., Sinha B., Rossen J.W. Diagnostic of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from blood samples: recent developments in molecular approaches. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018; 14: 944-55.
23. Opota O., Jaton K., Greub G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 21: 323-31.
24. Vernon S.D., Shukla S.K., Conradt J., Unger E.R., Reeves W.C. Analysis of 16S rRNA gene sequences and circulating cell-free DNA from plasma of chronic fatigue syndrome and non-fatigued subjects. *BMC Microbiol.* 2002; 2: 39.
25. Lagier J-C., Khelaifia S., Alou M.T., Ndongo S., Dione N., Hugon P. et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nature Microbiology.* 2016; 1: 1-8.
26. Borisova O.Yu., Aleshkin V.A., Kargaltseva N.M., Kocherovets V.I., Pastushenkov V.L., Karpova E.I. et al. The first case of isolation *Rothia mucilaginosa* in Russia from a patient's blood with a complication after plastic surgery. *Meditsinskiy Almanakh.* 2015; 5(40): 93-6. (in Russian)
27. Kargaltseva N.M. Method for diagnosing bacteremia. Patent RF № 2098486; 1997. (in Russian)
28. Humphrey A.A. Use of the buffy layer in the rapid diagnosis of septicemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 1944; 14: 358-62.
29. Samartsev V.A., Encheva Yu.A., Kuznetsova M.V., Karpunina T.I. Features of infection of burn wounds. *Novosti khirurgii.* 2014; 22(2): 199-206. (in Russian)
30. Gruver K.P., Zhuhovickij V.G., Beloborodov V.B. Clinical and epidemiological features of bacteremia. *Infektsionnye bolezni.* 2010; 8(4): 13-8. (in Russian)
31. Chebotkevich V.N., Bessmeltsev S.S., Kiseleva E.E., Stizhak N.P., Kaytandzhan E.I., Burylev V.V. Clinical and microbiological characteristics of bloodstream infections in oncohematological patients. *Onkogematologiya.* 2016; 11(3): 58-67. (in Russian)
32. Tatuljan A.A., Kondrateva E.I., Kleshhenko E.I., Trembach A.B. Analysis of detected bacteremias in patients with oncohematological pathology in a multidisciplinary children's hospital in Krasnodar. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skiy zhurnal.* 2016; 3(45): 68-73. (in Russian)
33. Chestnova T.V., Seregina N.V., Deshko I.V. Comparative analysis of the microbial landscape of pathogens isolated from blood of febrile patients. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy.* 2012; 19(2): 63-5. (in Russian)
34. Bagirova N.S. Taxonomic structure and antibiotic resistance of bloodstream infection pathogens in oncohematological patients. *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2015; 8(2): 191-200. (in Russian)
35. Arefeva L.I., Gorskaya E.M., Savostjanova O.A., Spirina T.S., Romashkina L.Yu., Gabrielyan I.I. Postoperative bacteremia in cardiac surgery patients. *Epidemiologiya I infektsionnye bolezni.* 2015; 20 (5): 19-23. (in Russian)
36. Gusarov B.G., Karpov O.Ye., Dementienko M.V., Nesterova E.E., Lashenkova N.N., Zamyatin M.N. Changing etiological structure and outcomes of bacteremia as a result of monitoring and management of antibiotic resistance in multidisciplinary hospital. *Meditsinskiy vestnik yuga Rossii.* 2017; 8(1): 51-9. (in Russian)
37. Doctrine of infection [Uchenie ob infektsii]. Vorob'yov A.A., ed. Moscow: Russkiy doctor; 2000. (in Russian)

Поступила 11.12.19

Принята к печати 15.12.19