

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Каргальцева Н.М.¹, Миронов А.Ю.^{2,3}, Борисова О.Ю.^{2,5}, Кочеровец В.И.², Карпова Е.И.^{4,5},
Данищук О.И.⁴, Козырева М.В.⁴

МИКРОБИОМ КРОВИ КЛИНИЧЕСКИ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА - МИФ ИЛИ РЕАЛЬНОСТЬ? (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Министерства обороны РФ, 194044, Санкт-Петербург, Россия;

²ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

³ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, 125212, Москва, Россия;

⁴ООО «Клиника Данищука», 107045, Москва, Россия;

⁵ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия

В настоящее время появилась концепция колонизации «стерильного» биотопа, которым является кровь. Современные молекулярно-генетические методы показали наличие бактериальной ДНК в крови практически здоровых лиц при отрицательной гемокультуре. Микробиом крови не изучен, но предполагают его клиническое влияние на здоровье человека. В крови обнаруживали: плеоморфные бактерии, хламидиоподобные микроорганизмы и в L-форме. RNA-Seq-технология позволяет обнаружить различные микроорганизмы, геном которых не совпадает с геномом человека. Основу микробиома крови составляют 4 доминирующих типа: Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroides. Знания о характере микробиома крови необходимы для совершенствования безопасности переливания крови.

Ключевые слова: биотоп; нестерильность крови; ПЦР; секвенирование

Для цитирования: Каргальцева Н.М., Миронов А.Ю., Борисова О.Ю., Кочеровец В.И., Карпова Е.И., Данищук О.И., Козырева М.В. Микробиом крови клинически здорового человека - миф или реальность? (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (4): 142-149. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-4-142-149>

Для корреспонденции: Каргальцева Наталья Михайловна, д-р. мед. наук., профессор кафедры биохимии и лабораторной диагностики; e-mail: kargaltseva@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.08.2023

Принята к печати 22.08.2023

Опубликовано 26.03.2024

Kargaltseva N.M.¹, Mironov A.Yu.^{2,3}, Borisova O.Yu.^{2,5}, Kocherovets V.I.², Karpova E.I.^{4,5}, Danishuk O.I.⁴, Kozyreva M.V.⁴

BLOOD MICROBIOME OF A CLINICALLY HEALTHY PERSON - MYTH OR REALITY? (REVIEW OF LITERATURE)

¹ S. M. Kirov military medical academy, 194044, Saint-Petersburg, Russian Federation

² G. N. Gabrichevsky research institute for epidemiology and microbiology, 125212, Moscow, Russian Federation;

³ Federal research and clinical center of specialized medical care and medical technologies FMBA of Russia, 125212, Moscow, Russian Federation;

⁴ LLC «Danishuk's clinic», 107045, Moscow, Russian Federation;

⁵ N. I. Pirogov russian national research medical university, 117997, Moscow, Russian Federation

At present, the concept of colonization of a «sterile» biotope, that is blood, has appeared. Modern molecular - genetic methods have shown the presence of bacterial DNA in the blood of practically healthy individuals with negative blood culture. Blood microbiome has not been studied, but its clinical impact on human health is suspected. In the blood there were found: pleomorphic bacteria, chlamydia-like microorganisms and in the L-form. RNA-Seq technology makes it possible to find various microorganisms whose genome does not correspond with the human genome. The 4 dominant types of blood microbiome are: Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and Bacteroides. Knowledge of the nature of blood microbiome is essential safer blood transfusion.

Key words: biotope; blood nonsterility; PCR; sequencing

For citation: Kargaltseva N.M., Mironov A. Yu., Borisova O. Yu., Kocherovets V.I., Karpova E.I., Danishuk O.I., Kozyreva M.V. Blood microbiome of a clinically healthy person - myth or reality? (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (4): 142-149 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.5160/0869-2084-2024-69-4-142-149>

For correspondence: Kargaltseva N. M., Ph.D. (Medicine), researcher; e-mail: kargaltseva@mail.ru

Information about authors:

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

Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;
Borisova O. Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>;
Kocherovets V.I., <https://orcid.org/0000-0001-7720-670X>;
Karpova E.I., <https://orcid.org/0000-0003-0510-1022>;
Danishuk O.I., <https://orcid.org/0000-0002-0022-4923>;
Kozyreva M.V., <https://orcid.org/0000-0001-7382-5984>.

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Acknowledgment. *The study was performed within the framework of sectoral program of Rosпотребнадзор.*

Received 17.08.2023

Accepted 22.08.2023

Published 26.03.2024

Понятие о микробиоме крови. Термин «микробиом» описывает генетический материал, кодирующий микробные популяции, колонизирующие различные биотопы организма человека (желудочно-кишечный тракт, полость рта, влагалище, наружные покровы) и применение молекулярно-генетических методов. Сформировалась новая концепция колонизации сообществом микроорганизмов «классически стерильного» биотопа, которым является кровь. Появились сообщения о наличии генетического материала микробов в крови, что привело к концептуализации микробиома крови, который важен для физического благополучия [1-6]. Для детекции микробиома крови применены различные подходы, включая метод амплификации гена 16SrRNA бактерий и полногеномное секвенирование. Термин «микробиота» относится к жизнеспособным культивируемым микроорганизмам, которые составляют микробные сообщества и могут быть выделены и идентифицированы с применением культурального метода исследования крови [5]. Развившиеся в организме человека патологические состояния связывают с изменением в составе микробиома крови, называемым «дисбиозом» [5, 7]. Если микробиом и микробиота кишечника человека изучены достаточно подробно, то про микробиом крови известно мало, поскольку исторически существовала догма о стерильности крови.

В настоящее время микробиом крови признан новым перспективным направлением исследований, прорывом в области значимости микробиома и его клинического влияния на здоровье и болезни человека [8, 9].

История микробиома крови. Первые идеи о присутствии бактерий в крови высказаны А.Кирчер ещё в 1656 году. В 1942 году M.R. Drennan [10] в своей работе опубликовал сомнение в отношении стерильности крови. В настоящее время вопрос стерильности крови оспаривается благодаря появлению доказательств существования микробиома крови. В 1969 году обнаружены L-формы бактерий и несколько штаммов *Staphylococcus epidermidis* в крови как у здоровых лиц, так и у страдающих тромбоцитопенией пациентов [11]. В этом же году сообщено о наличии жизнеспособных плеоморфных бактерий в крови клинически здоровых лиц внутри эритроцитов [11]. В 2001 году опубликована работа по обнаружению бактериальной ДНК в крови здоровых лиц методом количественной ПЦР (кПЦР) с использованием праймеров и зонда, специфичных к гену бактериальной 16SrRNA [6]. В 2004 году опубликован ряд статей о наличии хламидиоподобных микроорганизмов внутри

эритроцитов у клинически здоровых лиц [12, 13].

Методы детекции микробиома крови. Плеоморфные бактерии обнаружены в крови методом флуоресцентной гибридизации *in situ* и проточной цитометрии с использованием молекулярного исследования генов: 16SrRNA и *gyrB* [14]. Жизнеспособные плеоморфные бактерии в крови клинически здоровых лиц обнаружены при помощи тёмнопольной микроскопии в виде включений внутри эритроцитов. Из 25 проб крови здоровых лиц в 7 пробах обнаружены жизнеспособные, но некультивируемые плеоморфные бактерии. Они представляли собой высокоорганизованные образования, окружённые двойной мембраной без признаков наличия пептидогликана и внутриклеточных органелл. Достоверность полученных результатов подтверждена детекцией бактериальной ДНК в крови и гена 16SrRNA в ПЦР проб этой крови [11, 14]. В сыворотке крови здоровых людей также обнаружили бактериальные формы, имевшие морфологическое сходство с плеоморфными бактериями [6, 11].

При световой микроскопии в мазках, окрашенных по Граму, микроорганизмы напоминали хламидии и располагались внутри эритроцитов. При электронной микроскопии микроорганизмы внутри эритроцитов выглядели в виде клеток с ядроподобным образованием в центре, окружённые светлой зоной со стенкой [13].

В. Tsafarova и соавторы [15] для изучения жизненного цикла микробиоты крови использовали методы световой и электронной микроскопии. Морфологию и цикл пролиферации микробиоты крови исследовали на модели мононуклеарных клеток, выделенных из свежей взятой крови, и методом культивирования. Свободно циркулирующая микробиота в мононуклеарных клетках обладала четкой клеточной стенкой и размножалась путем почкования. Микробиота с дефицитом клеточной стенки формировала электронно-плотные или электронно-прозрачные тела, пролиферируемые делением. Электронно-прозрачные клетки увеличивались в размере и выделяли клетки – потомства через мембрану. Данный механизм пролиферации обозначили как «клетка внутри клетки» [15].

Представлены модифицированные культуральные методы для выделения нормальной микрофлоры крови: 1) классический с продолжительностью культивирования до 30 суток; 2) ускоренный - с продолжительностью культивирования 14 суток; 3) быстрый - с продолжительностью культивирования 3 суток [12]. При 7-суточном культуральном исследовании 60 образцов

крови здоровых доноров были получены положительные бактериальные гемокультуры в 35% случаев посева фракций эритроцитов и в 53% - фракций плазмы крови, тем самым доказано, что ряд микроорганизмов сохраняют свою жизнеспособность в крови. Выросшие микроорганизмы относились к некультивируемым формам микроорганизмов, которые не выделялись обычными стандартными культуральными методами [16].

Для подтверждения гипотезы существования дремлющей, неактивной микробиоты крови у здоровых людей использовали посев крови на сердечно-мозговой среде с питательными добавками и метод NGS. Выросшие культуры были микроскопированы с окраской по Граму и в электронной микроскопе. Анализ бактериальных видов проводили с помощью целевого секвенирования 16SrRNA. Полученные последовательности были сгруппированы с идентичностью в 97% в таксономические единицы. Среди культуральных и некультивируемых образцов выявили сходство с 17 типами, включая грибы [17].

В 2001 году S.I.J. Nikkari и соавт. [6] использовали кПЦР, состоящей из специфичных к rRNA флуоресцентные зонды и праймеры, нацеленные на консервативные участки 16S рибосомальной ДНК бактерий.

Результаты другого исследования с применением кПЦР, нацеленной на ген 16SrRNA, показали, что более 90% бактериальной ДНК находится в охристой оболочке и около 6% - в эритроцитах [1]. кПЦР позволила авторам получить 4×10^7 копий/мл генов 16SrRNA в крови, что эквивалентно 10^6 - 10^7 бактериальным геномам/мл, поскольку каждая бактерия имеет приблизительно от 1 до 15 копий 16S гена на геном [1, 18].

Чувствительные аналитические методы: целевая NGS и кПЦР определяют присутствие некультивируемых бактерий в образцах здоровой крови. Метод секвенирования гена rRNA показал наличие бактерии рода *Burkholderia*, результаты NGS – наличие *Romboutsia*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, and *Staphylococcus* в положительных гемокультурах. Однако, авторы отмечают, что большинство микробиот крови нельзя культивировать доступными методами по многим причинам [19].

Определяли ДНК свободно живущих бактерий, связанных с лейкоцитами и эритроцитами и свободную ДНК после разрушения клетки. В крови, в среднем, циркулирует 10^7 лейкоцитов/мл и 5×10^9 эритроцитов/мл, поэтому для авторов полученные показатели бактериальных геномов/мл (10^6 - 10^7) являлись правдоподобными [1].

Методы секвенирования РНК цельной крови, секвенирование следующего поколения (NGS), 16S секвенирование позволяют считывать различные микроорганизмы, несовпадающие с геномом человека, в качестве потенциальных микробных считываний, поэтому RNA-Seq - стала широко используемой технологией [9, 20]. Разработано 16S целевое метагеномное секвенирование специально для исследования микробиома крови с помощью 16SrRNA и кПЦР с контролем контаминантной ДНК [1]. Обследованы 30 практически здоровых доноров, кровь которых являлась отрицательной на наличие вирусов гепатита В и С, вируса Т-клеточного лейкоза человека, цитомегаловируса, возбудителей сифилиса, болезни Чагаса, малярии. Кровь отбиралась в две пробирки, одна из которых замораживалась для

экстракции ДНК, а другая - для получения плазмы крови, лейкоцитарного слоя и эритроцитов [1]. ДНК экстрагировалась из трёх фракций крови. Микробиом каждой фракции крови здоровых доноров описали с использованием секвенирования гена 16SrRNA и показали высокую дифференцированную характеристику составляющих. Исследование фракций цельной крови характеризовалось наибольшим количеством бактериальной ДНК в лейкоцитарном слое (93, 74%) и меньшим - в эритроцитах (6,23%) и плазме (0,03%) [1]. Количество копий 16SrRNA в лейкоцитарном слое коррелировало с концентрацией лейкоцитов, в эритроцитарной фракции - корреляции с концентрацией эритроцитов не отмечено. Целевое 16S метагеномное секвенирование показало наибольшее таксономическое разнообразие бактерий (индекс Шанон) во фракции эритроцитов ($2,16 \pm 0,30$) и меньшее - во фракции лейкоцитарного слоя ($1,49 \pm 0,47$) и плазмы крови ($1,50 \pm 0,47$) [1]. Контроли разработанной модели, концентрация и разнообразие микробиома исключили гипотезу, что часть микробиома является контаминацией [1].

Обсуждался вопрос о возможной контаминации пробы крови при взятии образца на преаналитическом этапе исследования или на аналитическом этапе при исследовании пробы [21, 22].

Ряд исследователей обращали внимание на недостаток при исследовании микробиома крови: количество бактерий в крови у практически здоровых лиц низкое, поэтому секвенирование бактериальной ДНК в образце, наличие в ПЦР ингибиторов и эукариотных продуктов осложняют проведение метагеномного анализа микробиоты крови [23]. При секвенировании для фона использовали маркерные полимеразы, содержащие бактериальные ДНК, что может быть ложно интерпретировано при исследовании образца крови [21].

Иммунная система и микробиота крови. Исторически иммунную систему рассматривают как антагонистическую бактериям для защиты хозяина от патогенов. В физиологических условиях иммунная система распознает комменсалов микробиоты через PRRs (рецепторы распознавания образов) и этот механизм необходим для восстановления тканей. Появился новый взгляд на полезную и симбиотическую роль взаимодействия микробиоты и иммунной системы. Микробиота из L-форм микроорганизмов, влияя на иммунную систему хозяина, способствует развитию системного воспаления, что важно для понимания патофизиологии и патогенеза заболеваний неясной этиологии [4, 7]. Показано влияние L-форм микроорганизмов крови как на здоровье, так и на развитие заболеваний и системного воспаления, что открывает альтернативное понимание патофизиологии у человека и патогенеза заболеваний с неизвестным источником инфекции [4].

Адгезия микроорганизмов на эритроцитах. Важно знать, как сохраняются бактерии в крови, так как кровь обладает бактериостатическими и бактериоцидными компонентами [7, 9]. Исследования последних лет с применением различных условий микробиологической культурологии, усовершенствованных методов культивирования бактерий, микроскопии крови, новейших поколений секвенирования показали, что микроорганизмы циркулирующие в кровотоке могут адгезироваться на эритроцитах и скрытно выживать внутри

эритроцитов [2, 16, 24 - 26]. Бактерии могут прилипать к поверхности эритроцитов (адгезия) и проникать внутрь эритроцитов (инвазия) [16, 27].

Связывание *Neisseria meningitidis* и *Escherichia coli* с эритроцитами происходит с помощью эритроцитарного рецептора комплемента CR1. Данное явление обозначено как комплемент-зависимое связывание грамотрицательных бактерий с эритроцитами, снижающее фагоцитоз бактерий и лейкоцитарно-окислительную реакцию в цельной крови человека [28].

Описана инвазия в эритроциты *Francisella tularensis in vivo* на модели лёгочной формы туляремии типа А мышей с использованием микроскопии двойной иммунофлюоресценции и инвазия *F. tularensis* в эритроциты *in vitro*, смоделированная на эритроцитах человека и показанная при помощи двойной иммунофлюоресценции, проточной цитометрии и сканирующей электронной микроскопии [29].

Способность микроорганизмов к адгезии на эритроцитах даёт микробным популяциям широкий диапазон влияния на иммунологические и регуляторные механизмы.

Механизм инвазии эритроцитов. Описаны два механизма проникновения патогенов в эритроциты. Бактерия тесно связывается с эритроцитом, формируется вакуоль, которая переносит бактерию внутрь цитоплазмы. При втором механизме эффекторы патогена действуют на цитозоль эритроцита [30]. Внутри эритроцита микроорганизмы находятся в состоянии покоя, но содержащееся в эритроците железо гемоглобина модулирует экспрессию фактора вирулентности, поэтому бактерии сохраняют патогенность [31, 32]. Сыворотка крови стимулирует инвазию эритроцитов микроорганизмами [29]. Инвазия эритроцитов играет роль в диссеминации инфекции и защите от иммунного ответа [29, 33, 34].

Появились работы о персистенции внутри эритроцитов *Streptococcus pneumoniae* [35] и *Staphylococcus epidermidis* [25]. С одной стороны, эритроциты повреждаются от свободного радикального окисления. С другой стороны, эритроциты имеют антиоксидантную защиту в виде супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. В эксперименте при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии определено, что при инфицировании *S. epidermidis* с высокой антиглобиновой активностью у эритроцитов повышалась активность СОД, как защита от микроорганизма, а при инфицировании *S. epidermidis* с высокой гемолитической экспрессией наблюдалось подавление СОД и каталазы эритроцита [36]. Внутриэритроцитарная инвазия более характерна для штаммов с антигемоглобиновой, чем для штаммов с гемолитической активностью. Антигемоглобиновая активность штамма стафилококка является маркером внутриэритроцитарной инвазии бактерий [25].

При изучении инвазии пневмококком и *S. aureus* эритроцитов оказалось, что ион железа поддерживает рост стафилококков и частично подавляет рост пневмококков за счёт образования гидроксильных радикалов. К элементам механизма инвазии эритроцитов отнесён карбокси-терминальный LPxTG-связывающий мотив (Leu-Pro-any-Thr-Gly), консервативный фрагмент поверхностных белков клеточной стенки грамположительных бактерий с функцией распознавания сигнала. Эритроциты человека частично ингибируют рост пневмококков путём генерации железо-индуцируемых сво-

бодных радикалов [35, 37].

Согласно гипотезы эритроцитарная инвазия *F. tularensis* осуществляется посредством белков системы секреции эритроцита [38].

Активаторами инвазии при полимикробной бактериемии могут быть экзотоксины микробов-ассоциантов. *S. epidermidis* с высокой антигемоглобиновой активностью под действием экзотоксинов *S. aureus*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae* в 2,5 раза усиливал свою адгезивную и инвазивную активность. Экзотоксины *S. saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium* spp. показали снижение в 1,5 раза уровня адгезии к эритроцитам и инвазии в эритроциты [26].

Как показано, инвазия эритроцитов может играть роль источника микробиома. Кровь здоровых доноров может содержать микробиом, включая патогенные виды, которые ответственны за эндогенный механизм инфекции кровотока, что необходимо учитывать при переливании крови [36, 39]. кПЦР и секвенирование могут определять микроорганизмы на первом этапе исследования донорской крови для исключения риска переливаемой донорской крови [1].

Микробиом и его роль при переливании крови. Новая концепция на циркуляцию микроорганизмов у практически здоровых лиц затрагивает проблему микробиома крови и его патогенетическую роль в службе переливания крови. Трансфузионно-передающиеся бактериальные инфекции (ТПБИ) являются причиной тяжёлых осложнений при переливании крови и высоких уровней летальности [36, 39]. Для клинической лабораторной диагностики ТПБИ целесообразно применять чувствительные с высокой пропускной способностью кПЦР и метод секвенирования, которые уже нашли применение на практике [40]. В ранних работах по ТПБИ показано, что существует количественное бактериальное несоответствие по наличию возбудителей инфекции в пробах крови у пациента после переливания крови (16,9%) и в пробах из стандартного набора для переливания крови (11,8%). По данным стандартизованных бактериальных скрининговых протоколов наличие бактерий в стандартных наборах для переливания крови определяли менее, чем в 0,1% случаев.

Описан микробиом крови, состоящий из нитевидных грибов и L-форм бактерий у детей с аутизмом и их матерей. Благодаря инновационной методологии авторам удалось выделить из крови популяции L-форм бактерий, преобразовать их в культивируемые, доказать их наличие при помощи световой и трансмиссивной электронной микроскопии, что актуально для диагностики латентной инфекции [7]. Выявлены *Aspergillus fumigatus* почти у всех детей с аутизмом, L-формы бактерий могли быть переданы ребёнку от матери до рождения и, таким образом, сделано заключение, что новорожденные дети уже были колонизированы этими микроорганизмами, что могло стать ведущей причиной расстройств развивающейся нервной системы в раннем детском возрасте [4].

Микробиом крови клинически здорового человека. Ранние исследования показали выделения только L-формы бактерий из крови здоровых людей [11]. В XXI веке новые инновационные молекулярные аналитические технологии позволили обнаружить некультивируемые бактерии, показать наличие бактериаль-

ной ДНК в крови здоровых людей и появиться гипотезе существования микробиома крови у клинически здорового человека [5, 41].

D. Castillo и соавторы [41] в обзорной статье демонстрируют доказательства существования микробиома крови у здорового человека и данные, отрицающие этот факт. В проекте «Микробиом крови здорового человека» участвовали 2000 человек со всего мира. Идея существования микробиома крови у здорового человека вызвала огромный интерес, поэтому изучали вопросы происхождения, идентичности, филогенетической принадлежности и клиническую значимость. При изучении появилось много противоречий. Инновационные аналитические технологии – целевая NGS гена 16SrRNA доказывали наличие здорового микробиома в крови [1, 5, 40]. В число сомнений включили влияние загрязняющих веществ из реагентов и лабораторной среды, бактериальное разнообразие и отсутствие исследований на наличие вирусов, грибов и архей [6, 14, 16, 42].

При изучении таксонов бактерий выявлен сходный состав микробиоты крови: *Proteobacteria* и *Fimicutes*, как доминирующие, и реже встречаемые - *Actinobacteria* и *Bacteroides* [1, 3, 5].

M. Rozenberga и соавторы [43] показали существование репрезентативного микробиома в крови человека на основе изучения происхождения экзогенных нуклеиновых кислот в крови и определения таксономических композиций при параллельном анализе гена 16SrRNA у одних и тех же людей в образцах полученных из кожи, влагалища, полости рта, фекалий и крови. Таксономический профиль во всех образцах крови включал преобладание *Proteobacteria* (91,8%) и реже *Firmicutes* (4,5%) и *Bacteroides* (1,7%). *Pseudomonas* был наиболее частым родом (86,1%) по сравнению с *Veillonella* (3,2%) и *Prevotella* (1,6%). Авторы отметили идентичные бактериальные варианты ампликонной последовательности в образцах крови и других биотопах до 27,4% случаев с преобладанием в мазках кожи, на основании чего предположили микробиоту кожи в роли источника для экзогенной ДНК в крови.

При идентификации на уровне типа в пробе контрольных доноров и доноров с астмой, соответственно, от общего количества бактериальной ДНК получены следующие данные: *Proteobacteria* (88% и 80,9%), *Actinobacteria* (7,8% и 7,1%), *Fimicutes* (3,5% и 9,2%), *Bacteroides* (0,1% и 2,2%) [5]. При идентификации на уровне рода преобладал род *Achromobacter* (51,1% и 45,3%), реже - род *Pseudomonas* (12,8% и 7,5%), род *Serratia* (0,9% и 11,6%), род *Sphingomonas* (3,8% и 5,1%), род *Staphylococcus* (5,5% и 2,8%), род *Corynebacterium* (3,2% и 5,5%), род *Acinetobacter* (3,7% и 2,8%) [1, 5, 16].

Фракционное исследование крови на таксономическом уровне показало следующее: преобладали бактерии класса *Sphingobacteria* в лейкоцитарном слое и плазме крови, *Clostridia* - в плазме и эритроцитах, *Flavobacteria* и *Fusobacteria* - в эритроцитах. Также во фракции эритроцитов представлены в значительном количестве бактерии родов: *Acinetobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Shewanella*, содержащие виды, которые являются патогенами, способными вызывать ТПБИ при переливании крови [1, 39].

P. D 'Aquila и соавторы [44] исследовали циркули-

рующий микробиом на пробах 1285 случайно выбранных стратифицированных по возрасту лиц из разных европейских стран в рамках проекта EC MARK-AGE с определением клинико-биохимических показателей. Результаты показали связь между числом копий микробной ДНК и географическим происхождением, половых и возрастных различий не выявлено. Обнаружена положительная связь с уровнем свободных жирных кислот, количеством лейкоцитов, уровнем инсулина и глюкозы. Перечисленные показатели играют роль в состоянии здоровья человека и возникновения заболеваний, поэтому авторы считают рассматривать микробиом крови как потенциальный биомаркер здоровья человека в диагностическом анализе клиницистов. Исследование было адекватно контролируемым, чтобы избежать загрязнения ДНК от наборов для экстракции и лабораторных реагентов [44].

Отрицается и подтверждается факт транслокации бактерий в кровотоки из биотопов организма. В крови чаще обнаруживают *Proteobacteria* (80%) и *Actinobacteria* (10%), которые не относятся к доминирующим в кишечном биотопе [1]. Другие биотопы также участвуют в механизме попадания бактерий или их ДНК в кровь [45 - 48].

По мнению F. Sciatta и соавторов [49], присутствие бактериального микробиома в здоровой крови – это горячая тема, в пользу которого появляется много доказательств, но есть и противоположное мнение. Исследования локализуются на понимание связи микробиома крови с развитием патологических заболеваний. Сохранение бактерий в крови в лейкоцитарной пленке, внутри мононуклеарных клеток периферической крови, внутри эритроцитов и в внеклеточных везикулах красной крови подтверждает наличие микробиома в здоровой крови.

При культуральном исследовании крови наиболее частыми таксонами, обнаруженными в крови 625 здоровых людей, были виды *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus* [16]. На основании посева крови, микроскопии и целевого секвенирования NGS-метода авторы заключили, что бактериальная ДНК в крови обусловлена существующей микробиотой крови, которая может сохраняться в течение многих лет в крови клинически здоровых лиц, т.е. без признаков болезней. Дремлющий микробиом присущ здоровым людям, но одновременно считают, что микробиом крови до сих пор глубоко не изучен и остается загадкой [17].

M. Demirci и соавторы [50] в обзорной статье пишут о том, что появились доказательства существования микробиоты крови и поддерживает влияние ее на здоровье и возникновение болезней. Результаты секвенирования 16SrRNA показали разные виды микробиоты крови при остром и хроническом коронарном синдроме, подобные результаты получили у пациентов с атеросклерозом и в здоровом контроле. Необходимы дальнейшие исследования для определения влияния микробиома крови на патогенез атеросклероза [51].

В гипотезе существования микробиома крови утверждается, что нормальная микробиота – это не вредные человеку-хозяину микроорганизмы, это – комменсалы, живущие в гармонии с экосистемой крови хозяина, как при иммунизации с живыми бактериальными и вирусными вакцинами [15].

Полученные данные разных исследователей свидетельствуют о существовании бактериальной ДНК у здорового человека, но ряд авторов выражают и сомнения по поводу того, что не являются ли обнаруженные бактерии транзиторными [52].

Альтернативная точка зрения на здоровый микробиом крови. В настоящее время используют кПЦП, специфичные rRNA, флюоресцентные зонды и праймеры, нацеленные на консервативные участки 16S рибосомальной ДНК бактерий для обнаружения некультивируемых бактерий в крови. Выдвинутую гипотезу существования здорового микробиома крови не поддержали ряд исследователей [20, 52, 42] и некоторые выразили сомнения [50].

Циркулирующие в крови микроорганизмы часто не растут в современных автоматизированных микробиологических анализаторах по причине несоответствующих питательных сред, условий культивирования и в силу своих биологических свойств (L-формы, некультивируемые формы), но определяются в крови у практически здоровых лиц. Известен механизм транслокации кишечных бактерий в кровотоки при заболеваниях и у практически здоровых лиц [2, 45, 53-57]. Некоторые исследователи ставят под сомнение существование микробиома крови и склоняются к позиции, что большинство выявленных микроорганизмов в крови относится к комменсалам из кишечника, полости рта и мочеполового тракта, которые характеризуются длительной колонизацией. Различные результаты по бактериальному составу микробиома крови не подтверждают гипотезу о том, что здоровый микробиом крови отвечает за функциональное состояние хозяина [20]. Микробные популяции в тканях коронарной артерии коррелируют с представителями микробиоты полости рта, куда бактерии могут транслоцироваться из полости рта в кровоток через поврежденную слизистую оболочку полости рта или при чистке зубов [3, 9, 45, 58].

M.U. Gogaуа и соавторы [52] предполагают, что бактерии здоровой крови могут быть не типичной микробиотой, а транзиторными микроорганизмами, которые играют роль в патогенезе неинфекционных заболеваний (диабет, сердечно-сосудистые).

S.C.S. Тап и соавторы [42] охарактеризовали ДНК микробов в крови 9770 здоровых людей с использованием данных секвенирования. Они идентифицировали 117 микробных видов в крови как комменсалов, связанных с кишечником, ртом, мочеполовым трактом и отличающихся от госпитальных культур крови. Авторы оценили результаты как бессимптомную транзиторную и спорадическую транслокацию микробов из разных участков тела в кровотоки, что у доноров является причиной гемотрансфузионного сепсиса.

Заключение. Существование микробиома крови у клинически здорового человека остается под вопросом. Данный обзор направлен на консолидацию последних опубликованных результатов по микробиому крови, которые представляют существующие противоречия и заявляют о перспективе дальнейших исследований.

Для подтверждения и отрицания существования здорового микробиома крови применяли современные микробиологические методы (световая, темнопольная и электронная микроскопия и фракционное культуральное исследование) и молекулярно-генетические

(флюоресцентная гибридизация *in situ*, проточная цитометрия, секвенирование генов 16SrRNA, целевое NGS, секвенирование цельной крови, RNA-Seq, кПЦП).

В опубликованных источниках представлены доказательства наличия L-форм бактерий, хламидиоподобных форм бактерий, плеоморфных бактерий и бактериоподобных структур в крови при отсутствии явного заболевания с помощью визуализации в световой микроскопии, темном поле, при электронной микроскопии. Методом ПЦП и флюоресцентной гибридизации *in situ* обнаруженные формы были ассоциированы с клетками крови и в подтверждение - определены жизнеспособные бактерии при культивировании крови в 62% проб донорской крови от доноров без явных симптомов заболевания.

Сохранение микроорганизмов в крови происходит за счет адгезии и инвазии в эритроциты и полинуклеарные клетки. Инвазия эритроцитов микроорганизмами рассматривается как источник микробиома, эндогенного инфицирования кровотока, диссеминации инфекции, в роли возбудителя инфекции при переливании крови. Фракционное исследование цельной крови показало наибольшее количество бактериальной ДНК в лейкоцитарном слое (93, 74%) и меньше - в эритроцитах (6,23%) и плазме (0,03%).

Чувствительные аналитические методы: целевая NGS и кПЦП определяли присутствие бактерий в образцах здоровой крови: таксоны *Proteobacteria* (91,8%) и *Fimicutes* (4,5%) были как доминирующие, и реже встречаемые - *Actinobacteria* и *Bacteroides* (1,7%).

Знания о 16S бактериальной ДНК и характеристике микробиома необходимы для совершенствования безопасности службы крови. Сообщество L-форм микроорганизмов в крови может составлять микробиоту крови. Отсутствие клеточной стенки и необычные биологические свойства микроорганизмов делает возможным выживание L-форм в крови. Трансмиссия L-форм в дифференцированные клетки хорошо просматривается методом электронной микроскопии на примере бактерий, дрожжевых и мицелиальных грибов, поэтому существует проблема при переливании донорской крови.

Опубликованные альтернативные данные подвергли сомнению гипотезу существования основного здорового микробиома крови на основании обнаружения разных микроорганизмов, использования нестандартных методов. Ключевыми противоречиями в этих исследованиях являлись: низкое содержание биомассы в крови, экзогенное загрязнение образцов крови, неопределенная жизнеспособность микроорганизмов по результатам микробиологического исследования, отсутствие углубленного изучения происхождения мультибиомных генетических материалов и более точных аналитических инструментов. В добавление к этому, технология выделения возбудителя из крови при микробиологическом исследовании малоэффективна в силу низкой концентрации в крови бактерий, наличия некультивируемых форм микроорганизмов, особенно у иммунокомпрометированных пациентов. Одним из механизмов циркуляции микроорганизмов в крови авторы считают транслокацию из различных биотопов организма, чаще всего из кишечника и полости рта.

Определение микробиома крови открывает возможности для разработки биомаркёров для клинической

лабораторной диагностики и терапевтических мишеней для лечения. Профилактика и лечение определенных заболеваний может быть нацелена на микробиом крови. Стратегия лечения на основе диагностики микробиома может быть использована в персонализированных лекарствах, но это требует дальнейших исследований.

Концепция микробного сообщества в крови клинически здорового человека остается спорной и является предметом дискуссий.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 1-23, 27-29, 33-52, 54-56, 58 СМ. REFERENCES)

24. Каргальцева Н.М., Борисова О.Ю., Кочеровец В.И., Миронов А.Ю., Карпова Е.И., Данищук О.И. и др. Лабораторная диагностика внегоспитальной инфекции кровотока при терапевтической патологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(10): 581-8.

25. Щуплова Е.А., Стадников А.А., Фадеев С.Б. Роль биологических свойств *Staphylococcus epidermidis* во внутриэритроцитарной инвазии и изменении активности каталазы и супероксиддисмутазы эритроцитов при экспериментальной генерализованной инфекции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015; 159(1): 79-82.

26. Щуплова Е.А. Роль микробов-ассоциантов в процессах взаимодействий бактерий с эритроцитами. *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2017; 209(9): 111-4.

30. Розов С.М., Дейнеко Е.В. Бактериальные внутриклеточные патогены: стратегии нападения и защиты. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(5): 464-79.

31. Миронов А. Ю., Леонов В.В. Железо, вирулентность и межмикробные взаимодействия условно-патогенных микроорганизмов. *Успехи современной биологии*. 2016; 136(3): 301-10.

32. Леонов В.В., Миронов А. Ю. Биоплёнообразование оппортунистических микроорганизмов в плазме крови в зависимости от содержания железа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(1): 52-4.

53. Катола В.М. О транслокации бактерий у практически здоровых людей. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2016; 61: 102-6.

57. Катола В.М. Об инфицировании крови в норме и при патологии. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2013; 47: 111-6.

REFERENCES

1. Paise S., Valle C., Servant F., Courtney M., Burcelin R., Amar J. et al. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. *Transfusion*. 2016; 56: 1138-47.

2. Potgieter M., Bester J., Kell D.B., Pretorius E. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. *FEMS Microbiol. Rev.* 2015; 39: 567-91.

3. Amar J., Lange C., Payros G., Garret C., Chabo Ch., Lantieri J. et al. Blood microbiota dysbiosis is associated with the onset of cardiovascular events in a large general population: the D.E.S.I.R. study. *Plos One*. 2013; 8: e54461.

4. Markova N. Dysbiotic microbiota in autistic children and their mothers: persistence of fungal and bacterial wall-deficient L-form variants in blood. *Scientific Reports*. 2019; 9: 13401. DOI: 10.1038/s41598-019-49768-9.

5. Whittle E., Leonard M.O., Harrison R., Gant T.W., Tonge D.P. Multi-Method characterization of the human circulating microbiome. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 9, Article 03266. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03266.

6. Nikkari S.I.J., McLaughlin W.Bi., Dodge D.E., Relman D.A. Does blood of healthy subjects contain bacterial ribosomal DNA? *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 1956-9.

7. Markova N. L-form bacteria cohabitants in human blood: significance for health and diseases. *Discovery Medicine*. 2017; 128: 305-13.

8. Amar J., Serino M., Lange C., Chabo C., Jacovoni J., Mondot S. et al. Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept. *Diabetologia*. 2011; 54: 3055-61.

9. Mangul S., Loohuis L.M.O., Ori A.P., Jospin G., Koslicki D., Yang H.T. et al. Total RNA sequencing reveals microbial communities in human blood and disease specific effects. *bioRxiv*. 2016, DOI: 10.1101/057570.

10. Drennan M.R. What is «Sterile blood?». *British Medical Journal*. 1942; 2: 526-6.

11. Tedeshi G.G., Amici D., Paparelli M. Incorporation of nucleosides and amino-acids in human erythrocyte suspensions: possible relation with a diffuse infection of mycoplasmas or bacteria in the L-form. *Nature*. 1969; 222: 1285-6.

12. Kalfin E. Is there normal blood flora? *Internet J. Microbiol.* 2006; 3(1): 1-4.

13. Kalfin E. Chlamydia-like microorganisms live in donor's blood as normal flora. *Internet J. Internal Medicine*. 2004; 5(2): 1-7.

14. McLaughlin R.W., Vali H., Lau P.C.K., Palfree R.G.E., De Ciccio A., Sirois M. et al. Are there naturally occurring pleomorphic bacteria in the blood of healthy humans? *J. Clin. Microb.* 2002; 40(12): 4771-5.

15. Tsafarova B., Hodzhev Y., Yordanov G., Tolchkov V., Kalfin R., Panaiotov S. Morphology of blood microbiota in healthy individuals assessed by light and electron microscopy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2023; 12, Article 1091341. DOI: 10.3389/fcimb.2022.1091341.

16. Damgaard C., Magnussen K., Enevold C., Nilsson M., Tolker-Nielsen T., Holmstrup P. et al. Viable bacteria associated with red blood cells and plasma in freshly drawn blood donations. *PLoS One*. 2015; 10: e0120826.

17. Panaiotov S., Filevski G., Equestre M., Nikolova E., Kalfin R. Cultural isolation and characteristics of the blood microbiome of healthy individuals. *Advances in Microbiology*. 2018 ; 8: 406-21.

18. Vetrovsky T., Baldrian P. The Variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One*. 2013; 8(2): e57923.

19. Raeisi J., Oloomi M., Zolfaghari M.R. Bacterial DNA detection in the blood of healthy subjects. *Iranian Biomedical Journal*. 2022; 26 (3) : 230-9.

20. Cheng H.S., Tan S.P., Wong D.M.K., Koo W.L.Y., Wong S.H., Tan N.S. The blood microbiome and health: Current evidence, controversies and challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24: 5633.

21. Salter S.J., Cox M.J., Turek E.M., Calus S.T., Cookson W.O., Moffatt M.F. et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 2014; 12: 87.

22. Dawson S. Blood culture contaminants. *J. Hosp. Infect.* 2014; 87: 1-10.

23. Tichopad A., Didier A., Pfaffl M.W. Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants. *Mol. Cell Probes*. 2004; 18: 45-50.

24. Kargaltseva N.M., Borisova O.Yu., Kocherovets V.I., Mironov A.Yu., Karpova E.I., Danishuk O.I. et al. Laboratory diagnosis of community-acquired bloodstream infection in therapeutic pathology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(10): 581-8. (in Russian)

25. Shchuplova E.A., Stadnikov A.A., Fadeev S.B. The role of the biological properties of *Staphylococcus epidermidis* in intraerythrocyte invasion and changes in the activity of erythrocyte catalase and superoxide dismutase in experimental generalized infection. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2015; 159(1): 79-82. (in Russian)

26. Shchuplova E.A. The role of microbes-associates in the processes of interactions of bacteria with erythrocytes. *Byulleten' Orenburgskogo gosudarstvennogo Universiteta*. 2017; 209(9): 111-4. (in Russian)

27. Wang Z., Zhang L., Guo Z., Liu L., Ji J., Zhang J. et al. A unique feature of iron loss via close adhesion of *Helicobacter pylori* to host erythrocytes. *PLoS One*. 2012; 7(11): e50314.

28. Brekke O-L., Hellerud B.C., Christiansen D., Fure H., Castellheim A., Nielsen E.W. et al. *Neisseria meningitidis* and *Escherichia coli* are protected from leukocyte phagocytosis by binding to erythrocyte complement receptor 1 in human blood. *Mol. Immunol.* 2011; 48 (15-16): 2159-69. DOI: 10.1016/j.molimm.2011.07.011.

29. Horzempa J., O'Dee D.M., Stolz D.B., Franks J.M., Clay D., Nau G.J. Invasion of erythrocytes by *Francisella tularensis*. *J. Infect. Dis.* 2011; 204: 51-9.

30. Rozov S.M., Deineko E.V. Bacterial intracellular pathogens: attack and defense strategies. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(5): 464-79. (in Russian)

31. Mironov A.Yu., Leonov V.V. Iron, virulence and intermicrobial interactions of opportunistic microorganisms. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2016; 136(3): 301-10. (in Russian)

32. Leonov V.V., Mironov A.Yu. Biofilm formation of opportunistic microorganisms in blood plasma depending on the iron content. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 61(1): 52-4. (in Russian)
33. Deng K., Blick R.J., Liu W., Hansen E.J. Identification of *Francisella tularensis* genes affected by iron limitation. *Infect. Immune*. 2006; 74: 4224-36.
34. Maurin M., Raoult D. Use of aminoglycosides in treatment of infectious due to intracellular bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2001; 45: 2977-86.
35. Yamaguchi M., Terao Y., Mori-Yamaguchi Y., Domon H., Sakae Y., Yagi T. et al. *S. Streptococcus pneumoniae* invades erythrocytes and utilizes them to evade human innate immunity. *PLoS One*. 2013; 8(10): e77282.
36. Brecher M.E., Hay S.N. Bacterial contamination of blood components. *Clin. Microbiol. Rev*. 2005; 18: 195-204.
37. Marraffini L.A., Dedent A.C., Schneewind O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev*. 2006; 70: 192-221.
38. Schmitt D.M., Barnes R., Rogerson T., Haught A., Mazzella L.K., Ford M. et al. The role and mechanism of erythrocyte invasion by *Francisella tularensis*. *Front.Cell.Infect.Microbiol*. 2017; 7, Article 00173. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00173.
39. Lafeuillade B., Eb F., Ounnoughene N., Petermann R., Daurat G., Huyghe G. et al. Residual risk and retrospective analysis of transfusion-transmitted bacterial infection reported by the French National Hemovigilance Network from 2000 to 2008. *Transfusion*. 2015; 55: 636-46.
40. Gosiewski T., Flis A., Sroka A., Kedzierska A., Pietrzyk A., Kedzierska J. et al. Comparison of nested, multiplex, qPCR; FISH; SeptiFast and blood culture methods in detection and identification of bacteria and fungi in blood of patients with sepsis. *BMC Microbiol*. 2014; 14: 313.
41. Castillo D.J., Rifkin R., Cowan D.A., Potgieter M. The healthy human blood microbiome: fact or fiction? *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2019; 9, Article 00148. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00148.
42. Tan C.C.S., Ko K.K.K., Chen H., Liu J., Loh M. No evidence for a common blood microbiome based on a population study of 9,770 healthy human. *Nature Microbiology*. 2023; 8 : 973-85.
43. Rozenberga M., Saksis R., Elbere I., Birzniece L., Briviba M., Konrade I. et al. Identification of the composition, stability, and origin of blood microbiome in humans. *Research Square*. 2022; Article 2019063. DOI: 10.21203/rs.3.rs - 2019063/v1.
44. D'Aquila P., Giacconi R., Malavolta M., Piacenza F., Burkle A., Villanueva M.M. et al. Microbiome in blood samples from the general population recruited in the MARK-AGE Project: A pilot study. *Frontiers in Microbiology*. 2021; 12. Article 707515. DOI: 10.3389/fmicb.2021.707515.
45. Ono S., Tsujimoto H., Yamauchi A., Hiraki Sh., Takayama E., Mochizuki H. Detection of microbial DNA in the blood of surgical patients for diagnosing bacterial translocation. *World J. Surg*. 2005; 29: 535-9.
46. Costello E.K., Lauber C.L., Hamady M., Fierer N., Gordon J.I., Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009; 326(5960): 1694-7.
47. Tommaso N.D., Santopaolo F., Gasbarrini A., Ponziani F.R. The gut-vascular barrier as a new protagonist in intestinal and extraintestinal diseases. *Int. J. Mol. Sci*. 2023; 24: 1470.
48. Balzan S., Quadros C.A., Cleva R., Ziberstein B., Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J. Gastroenterology Hepatology*. 2007; 22: 464-71.
49. Sciarra F., Franceschini E., Campolo F., Venneri M.A. The diagnostic potential of the human blood microbiome: are we dreaming or awake? *Int. J. Mol. Sci*. 2023; 24 : 10422. DOI: 10.3390/ijms 241310422.
50. Demirci M., Saribas A.S., Siadat S.D., Kocazeybek B.S. Editorial: blood microbiome in health and disease. *Front.Cell.Infect.Microbiol*. 2023; 13, Article 1187247. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1187247.
51. Khan Ik., Khan Im., Usman M., Jianye Z., Wei Z., Zhiqiang L. et al. Analysis of the blood bacterial composition of patients with acute coronary syndrome and chronic coronary syndrome. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2022; 12. Article 943808. DOI: 10.3389/fcimb.2022.943808.
52. Goraya M.U., Gu L., Mannan A., Wang G., Li R., Deng H. Human circulating bacteria and dysbiosis in non-infectious diseases. *Front. Cell.Infect.Microbiol*. 2022; 12, Article 932702. DOI: 10.3389/fcimb.2022.932702.
53. Katola V.M. On the translocation of bacteria in practically healthy people. *Byulleten` fiziologii i patologii dykhaniya*. 2016; 61: 102-6. (in Russian)
54. Epstein S.S. The phenomenon of microbial uncultivability. *Curr. Opin. Microbiol*. 2013; 16: 636-42.
55. Kim T.J., Weinstein M.P. Update on blood cultures: how to obtain, process, report and interpret. *Clin. Microbiol. Infect*. 2013; 19: 513-20.
56. Pohlod D.J., Mattman L.H. Tunstall L. Structures suggesting cell-wall-deficient forms detected in circulating erythrocytes by fluorochrome staining. *Appl. Microbiol*. 1972; 23(2): 262-7.
57. Katola V.M. On blood infection in normal and pathological conditions. *Byulleten` fiziologii i patologii dykhaniya*. 2013; 47: 111-6. (in Russian)
58. Lehtiniemi J., Karhunen P.J., Goebeler S., Nikkari S., Nikkari S.T. Identification of different bacterial Dnas in human coronary arteries. *Eur. J. Clin. Invest*. 2005; 35: 13-6.