

2
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Оренбургская область
Гора Змеиная
Вельмовский П.В.



2023

УЧРЕДИТЕЛЬ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

© Н.М. Каргальцева, 2023

УДК 579.262

Н.М. Каргальцева

ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО СЛОЯ ПРОБЫ КРОВИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ КРОВОТОКА

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова МО РФ, 194044, Санкт-Петербург, Россия

Инфекция кровотока осложняет большинство соматических заболеваний и имеет высокий уровень летальности, который зависит от географии страны и вида инфекции кровотока. Летальность связывают с неэффективной диагностикой инфекции кровотока. В представленной работе материалом для исследования служил лейкоцитарный слой пробы крови амбулаторных пациентов, который применяли для микроскопической и культуральной диагностики инфекции кровотока. При микроскопии были обнаружены микроорганизмы (97,1%), ассоциации бактерий с грибами (66,9%), мицелиальные формы грибов (69,0%). При посеве материала у 48% пациентов диагностировали инфекцию кровотока, этиология которой характеризовалась грамположительными кокками (51,4%) и полимикробностью (33,5%). Лейкоцитарный слой может служить материалом для ускоренного получения гемокультуры и экспресс-метода диагностики инфекции кровотока.

Ключевые слова: лейкоцитарный слой, инфекция кровотока, микроскопия крови, гемокультура.

N.M. Kargaltseva

THE USE OF A LEUKOCYTE LAYER OF A BLOOD SAMPLE TO DIAGNOSE A BLOODSTREAM INFECTION.

S. M. Kirov military medical academy, Saint-Petersburg, Russia

Bloodstream infection complicates most somatic diseases and has a high mortality rate, which depends on the geography of the country and the type of bloodstream infection. Lethality is associated with ineffective diagnosis of bloodstream infection. In the presented work, the material for the study was the leukocyte layer of the blood sample of outpatients, which was used for microscopic and cultural diagnostics of bloodstream infection. Microscopy revealed microorganisms (97.1%), symbiosis of bacteria with fungi (66.9%), mycelial forms of fungi (69.0%). During sowing, 48% of patients were diagnosed with a bloodstream infection, the etiology of which was characterized by gram-positive cocci (51.4%) and polymicrobial activity (33.5%). The leukocyte layer is a material for accelerated hemoculture and an express method for diagnosing bloodstream infection.

Key words: leukocyte layer, bloodstream infection, blood microscopy, hemoculture.

Введение

Актуальность микробиологической диагностики инфекции кровотока (ИК) связана с осложнениями, утяжелением течения основного соматического заболевания и высоким уровнем летальности у терапевтических пациентов. ИК осложняет пневмонию (63,2%), фарингит, целлюлит, заболевания мочевыводящих путей (30,9%), периодонтит (42,5%), трансплантацию алло-

генных гемопоэтических стволовых клеток, применение катетеров, некротирующий энтероколит, травму, патологию в блоке интенсивной терапии (20%), онкогематологические заболевания, при COVID-19 (34,1%) [1-6].

При ИК отмечают разные уровни летальности, которые зависят от географического расположения стран: до 48,0% – в странах Европы, до 18,1% – в странах Африки, до 64,6% – в Северном Вьетнаме, до 40% случаев – в США, Ирландии, Финляндии, Дании, Франции, Канаде [7-9]. В России летальность у онкогематологических больных достигает 49%, при генерализованной форме катетер-ассоциированной инфекции кровотока – до 18%, при инфекционном эндокардите – до 25% случаев, до 33% – при заболеваниях мочевыводящих путей, до 37% – при целлюлите [2, 4, 10, 11]. Летальность отличается также в зависимости от вида ИК: при госпитальной ИК она составляет 26%, при ИК, ассоциированной с оказанием медицинской помощи, – 19%, внегоспитальной ИК (ВГИК) – 16% случаев [12, 13]. Неблагоприятный исход осложнений связывают с неэффективной диагностикой ИК.

По данным зарубежных авторов отмечается низкий уровень диагностики ИК при использовании ручных методов исследования крови (2%) и большой разброс в получении гемокультур на автоматизированных системах гемокультивирования (от 3 до 43,7%) [3, 14, 15]. В России проводят микробиологическое исследование крови согласно Приказу № 535 от 1985 года, который в настоящее время отменен. Некоторые лаборатории используют импортные гемокультуральные автоматизированные системы. Диагностика ИК при исследовании крови пациентов онкогематологического профиля колеблется от 24,1% до 39,2% случаев [1-3].

За рубежом проводят микроскопию мазка крови на преаналитическом этапе как дополнительный тест к бактериологическому исследованию крови, что позволяет диагностировать бактериальные, грибковые и паразитарные инфекции [16-18]. По результатам микроскопии мазков крови ставили диагноз и назначали эмпирическую терапию.

Обнаружение и выделение микроорганизмов из крови требует совершенствования методов диагностики и поиск новых лабораторно-технологических подходов к получению гемокультуры и экспресс-диагностики ИК.

Цель исследования – повысить эффективность микробиологической диагностики ИК у пациентов с терапевтическими заболеваниями путем применения лейкоцитарного слоя для исследования крови.

Материал и методы

Материалом для исследования служили пробы крови амбулаторных пациентов с подозрением на ВГИК с различными диагнозами по направлению клиницистов из медицинских учреждений. Микробиологические методы (микроскопический и культуральный) проводили согласно методическим рекомендациям «Микробиологические методы диагностики инфекции кровотока» (Комитет по здравоохранению Санкт-Петербурга, 2010 г.) и патентам [19, 20]. Для получения лейкоцитарного слоя у внегоспитальных больных отбирали венозную кровь в количестве 4,5 мл в закрытую вакуумную систему промышленного производства для крови с содержанием 0,5 мл цитрата натрия, затем шприц удаляли из вены, иглу снимали, отламывали поршень, систему в виде пробирки доставляли в лабораторию. После центрифугирования верхний светлый слой плазмы удаляли стерильной пипеткой, лейкоцитарный слой в виде тонкой белой полоски лежал на эритроцитах. Капли слоя наносили на высокопитательные кровяные агары в чашках Петри для культивирования в аэробных и анаэробных условиях [19] и на 2 стекла для приготовления мазков техникой «двух стекол» с окрашиванием по Граму [20]. Препараты микроскопировали при x1000 увеличении; использовали микроскопы: МИКРОМЕД-1, ЛОМО, Россия (иммерсионный объектив МИ 90–1,25 и окуляр К 7).

Результаты и обсуждение

На основе микробиологического исследования проб крови 382 амбулаторных пациентов ВГИК диагностировали у 183 (48,0%) человек. Этиологию ВГИК изучали на 297 выделенных штаммах микроорганизмов.

Из клинических симптомов у внегоспитальных больных наблюдали повышенную температуру тела в 61,7% случаев. Гендерные и возрастные характеристики пациентов с ИК представлены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристики внегоспитальных больных с ИК

Показатели	Внегоспитальные больные с ИК (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 видно, что ВГИК чаще регистрировали у женщин, чем у мужчин (65,6% и 34,4% соответственно; $p < 0,001$). В изучаемой группе пациенты были распределены на возрастные группы: 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). ВГИК чаще встречалась в 1-й группе пациентов (74,9%) и реже во 2-й (19,7%) и 3-й (5,5%), то есть обращались за медицинской помощью чаще люди молодого возраста.

При прямом посеве лейкоцитарного слоя было выделено 297 штаммов микроорганизмов, характеристики которых представлены в таблице 2.

Таблица 2. Характеристики выделенных микроорганизмов из крови внегоспитальных больных с ИК

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
Показатели	Бактерии (n=290)				Грибы (n=7)				
	Грам (+) кокки	Грам (+) палочки	Грам (-) палочки	Грам (-) короткие палочки	Дрожжи	Плесневые			
Количество	149	107	28	6	4	3			
%	51,4	36,9	9,6	2,1	57,1	42,9			
95% ДИ	45,6-57,1	31,5-42,6	6,8-13,6	1,0-4,4					

В состав возбудителей ВГИК входили аэробные (73,4%) и анаэробные бактерии (24,2%), а также грибы (2,4%). Как видно из таблицы 2, лидировали грамположительные кокки (51,4%) и грамположительные палочки (36,9%), реже выделяли – грамотрицательные палочки (9,6%) и грамотрицательные короткие палочки (2,1%). Грибы р. *Candida* выделялись чаще плесневых (57,1 и 42,9% соответственно, $p > 0,05$). Идентифицированные микроорганизмы относились к 32 родам и 48 видам. В группе грамположительных кокков преобладал *S. epidermidis* (25,8%), в единичных случаях встречались *S. aureus* (4,4%), *S. haemolyticus* (2,0%), *S. mitis* (4,7%). Среди анаэробов доминировала *Cutibacterium acnes* (21,5%). Дрожжевые и плесневые грибы давали единичный рост. Этиология ВГИК характеризовалась грамположительными микроорганизмами кокковой формы. Следующая особенность ВГКИ состояла в том, что бактериемия характеризовалась полимикробностью (33,5%); в одной пробе крови выделяли одновременно два, три или четыре разных микроорга-

низма (75,4%, 18,8% и 5,8% соответственно). Ассоциации полимикробности отличались разными комбинациями, состоявшими 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%).

Лейкоцитарный слой так же использовали в качестве материала для микроскопического исследования пробы крови. Готовили по два стекламозка и окрашивали по Граму. Было просмотрено 339 мазков внегоспитальных пациентов. Микроорганизмы были обнаружены в 329 (97,1%) мазках. По операционным характеристикам метод обнаружения микроорганизмов в лейкоцитарном слое показал чувствительность в 100%, специфичность – 74,4%, прогноз положительного результата – 82,3%, относительный риск – 1,1%. Морфологическая характеристика обнаруженных микроорганизмов представлена в таблице 3.

Таблица 3. Обнаруженные микроорганизмы в мазках крови больных с ВГИК

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

Ассоциации бактерий с грибами обнаруживали в 2,2 раза чаще, чем одни бактерии или грибы в мазках крови (66,9%, 31,0% и 2,1% соответственно). В настоящее время бактериально-грибковый симбиоз приобретает патогенетическое значение. Отдельные грибы реже видны в мазках по сравнению с симбиозом их с бактериями. При отрицательной гемокультуре диагностировали ИК микроскопическим методом в 61,3% случаев. Диагностическое значение микроскопии мазка крови заключалось в обнаружении бактерий, дрожжевых клеток, мицелиальных форм гриба, ассоциации бактерий с грибами на фоне отсутствия выделения грибов из крови. Мицелиальные формы были обнаружены в 69,0% случаев. Микроскопическая техника исследования крови позволила показать наличие двух форм у грибов в крови. Ценность микроскопического метода заключается в расширении диагностической информативности при ИК, в обнаружении микроорганизмов, не дающих рост в гемокультурах.

Заключение

Культуральное исследование лейкоцитарного слоя в образцах крови с

инкубированием в аэробных и анаэробных условиях позволило диагностировать ВГКИ у 48,0% терапевтических пациентов и чаще у женщин молодого возраста. Выделенные 297 штаммов микроорганизмов состояли из аэробных (73,4%) и анаэробных бактерии (24,2%), а также грибов (2,4%). Ведущими этиологическими агентами ВГИК были грамположительные кокки. ВГИК характеризовалась полимикробностью гемокультур (33,5%) с одновременным выделением от 2-х до 4-х различных микроорганизмов в одной пробе крови.

Микроскопический метод исследования лейкоцитарного слоя расценили как экспресс-метод диагностики ИК по скорости получения предварительного ответа (2 часа) и по возможности назначения эмпирической антимикробной терапии. Из 339 мазков внегоспитальных пациентов микроорганизмы были обнаружены в 97,1% случаев. Среди обнаруженных морфологических форм чаще фигурировали ассоциации бактерий с грибами (66,9%). Особенностью микроскопического метода является то, что он способен выявлять микроорганизмы в пробе крови при отрицательной гемокультуре (61,3%), в том числе мицелиальные формы грибов (69,0%). Положительные находки при микроскопии устанавливают диагностическую связь между выявленными в крови микроорганизмами и вероятностью ИК.

Применение лейкоцитарного слоя пробы крови, представляющего собой концентрат микроорганизмов с лейкоцитами крови, обладает высокой диагностической эффективностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахмедов М.И., Клясова Г.А., Паровичникова Е.Н. и др. Инфекция кровотока в разные фазы реконституции у больных после первой трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Онкогематология. 2022. 17 (1): 121-134.
2. Орлова О.А., Семенов Т.А., Акимкин В.Г. и др. Клинико-эпидемиологическая характеристика катетер-ассоциированных инфекций кровотока у пациентов онкогематологического профиля. Медицинский Алфавит, 2020. 34: 9-12.
3. Куцевалова О.Ю., Козель Ю.Ю., Дмитриева В.В. и др. Комплексный подход к диагностике бактериальной и грибковой инфекций кровотока у пациентов онкологического профиля. Южно-российский Онкологический Журнал. 2020. 1 (4): 15-21.
4. Полибин Р.В., Миндлина А.Я., Герасимов А.А. и др. Сравнительный анализ смертности от инфекционных болезней в Российской Федерации и некоторых странах Европы. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017. 94 (3): 4–10.
5. Dhotre S., Jahagirdar V., Suryawanshi N. et al. Assessment of periodontitis and its role in viridians streptococcal bacteremia and infective endocarditis. Indian Heart J. 2018. 70 (2): 225–232.
6. Sogaard K.K., Baetting V., Osthoff M. et al. Community-acquired and hospital-acquired respiratory tract infection and bloodstream infection in patients hospitalized with COVID-19

- pneumonia. *J. Intensive Care*. 2021. 9 (1): 1-10.
7. De Kraker M.E.A., Davey P.G., Grundmann H. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia. Estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. *PloS Med*. 2011. 8 (10): e1001104–12.
 8. McNamara J.K., Righi E., Wright H. Long-term morbidity and mortality following bloodstream infection: A systematic literature review. *J. Infection*. 2018. 77 (1): 1–8.
 9. Mehl A., Asvold B.O., Lydersen S. et al. Burden of bloodstream infection in an area of Mid-Norway 2002-2013: a prospective population-based observational study. *BMC Infect. Dis*. 2017. 17 (1): 205–219.
 10. Карпин В.А., Зулфигарова Б.Г. Анализ летальности больных инфекционным эндокардитом в г. Сургуте. *Вестник Сургутского государственного университета*. 2017. 3 (33): 27–29.
 11. Navadeep R.K., Ramesh B.M., Neema M.A. Study of bacteremia in patients with cellulitis of legs. *International J. Recent Scientific Research*. 2017. 8 (5): 17045–17046.
 12. Koch A.M., Nilsen R.M., Eriksen H.M. et al. Mortality related to hospital-associated infections in a tertiary hospital; repeated cross-sectional studies between 2004-2011. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2015. 4: 57–65.
 13. Lenz R., Leal J.R., Church D.L. et al. The distinct category of healthcare associated bloodstream infections. *BMC Infect Dis*. 2012. 12: 85–90.
 14. Li G., Sun J., Pan S. et al. Comparison of the performance of three blood culture systems in a Chinese tertiary-care hospital. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2019. 9: 285–294.
 15. Opota O., Croxatto A., Prodhom G. et al. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin. Microbiol. Infect*. 2015. 21: 313–322.
 16. Hirai Y., Asahata S., Ainoda Y. et al. Candidemia diagnosed from peripheral blood smears: case report and review of literature 1954-2013. *Mycopathologia*. 2015. 180 (1-2): 111-16.
 17. Manzoni D., Sujobert P. Diagnosis of bacteremia on a blood smear. *Blood*. 2015. 125 (13): 2173.
 18. Rana C. Gram negative bacteremia diagnosed on peripheral blood smear examination. *J. Hematol*. 2015. 4 (1): 155–156.
 19. Каргальцева Н.М. Патент RU 2 098 486 C1 Российская Федерация, МПК 6 C12Q 1/04. Способ диагностики бактериемии; заявитель и правообладатель Каргальцева Н.М. № 2098486; Бюл., 1997. № 34.
 20. Каргальцева Н.М., Кочеровец В.И., Борисова О.Ю. и др. Патент RU 2 616 249 C1 Российская Федерация; МПК G01N 33/48. Способ экспресс-диагностики инфекции кровотока; заявитель и правообладатель ФБУН МНИИЭМ имени Г.Н. Габричевского Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. № 2616249; Бюл., 2017. № 11.

Поступила 29 июня 2023 г.

(Контактная информация: Каргальцева Наталья Михайловна – доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ; адрес: Россия, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, тел. +7 911-783-16-92; e-mail: kargaltseva@mail.ru)

REFERENCES

1. Ahmedov M.I., Kljasova G.A., Parovichnikova E.N. et al. Infection of blood flow in different phases of reconstruction in patients after the first transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells. *Oncohematologia*. 2022. 17 (1): 121-134.
2. Orlovq O.A., Semenenko T.A., Akimkin V.G. et al. Clinical and epidemiological characteristics of catheter-associated bloodstream infections in patients with oncohematological pro-

- file. Medical Alphabet. 2020. 34: 9-12.
3. Kucevalova O.Ju., Kozel Ju.Ju., Dmitrieva V.V. et al. An integrated approach to the diagnosis of bacterial and fungal infections of the bloodstream in cancer patients. South Russian Journal of Oncology. 2020. 1 (4): 15-21.
 4. Polibin R.V., Mindlina A.Ja., Gerasimov A.A. et al. Comparative analysis of mortality from infectious diseases in the Russian Federation and some European countries. Epidemiology and Vaccine Prevention. 2017. 94 (3): 4–10.
 5. Dhotre S., Jahagirdar V., Suryawanshi N. et al. Assessment of periodontitis and its role in viridians streptococcal bacteremia and infective endocarditis. Indian Heart J. 2018. 70 (2): 225–232.
 6. Sogaard K.K., Baetting V., Osthoff M. et al. Community-acquired and hospital-acquired respiratory tract infection and bloodstream infection in patients hospitalized with COVID-19 pneumonia. J. Intensive Care. 2021. 9 (1): 1-10.
 7. De Kraker M.E.A., Davey P.G., Grundmann H. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia. Estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. PloS Med. 2011. 8 (10): e1001104–12.
 8. Mc Namara J.K., Righi E., Wright H. Long-term morbidity and mortality following bloodstream infection: A systematic literature review. J. Infection. 2018. 77 (1): 1–8.
 9. Mehl A., Asvold B.O., Lydersen S. et al. Burden of bloodstream infection in an area of Mid-Norway 2002-2013: a prospective population-based observational study. BMC Infect. Dis. 2017. 17 (1): 205–219.
 10. Karpin V.A., Zulfigarova B.G. Analysis of mortality of patients with infectious endocarditis in Surgut. Bulletin of Surgut State University. 2017. 3 (33): 27–29.
 11. Navadeep R.K., Ramesh B.M., Neema M.A. Study of bacteremia in patients with cellulitis of legs. International J. Recent Scientific Research. 2017. 8 (5): 17045–17046.
 12. Koch A.M., Nilsen R.M., Eriksen H.M. et al. Mortality related to hospital-associated infections in a tertiary hospital; repeated cross-sectional studies between 2004-2011. Antimicrob. Resist. Infect. Control. 2015. 4: 57–65.
 13. Lenz R., Leal J.R., Church D.L. et al. The distinct category of healthcare associated bloodstream infections. BMC Infect Dis. 2012. 12: 85–90.
 14. Li G., Sun J., Pan S. et al. Comparison of the performance of three blood culture systems in a Chinese tertiary-care hospital. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2019. 9: 285–294.
 15. Opota O., Croxatto A., Prodhom G. et al. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. Clin. Microbiol. Infect. 2015. 21: 313–322.
 16. Hirai Y., Asahata S., Ainoda Y. et al. Candidemia diagnosed from peripheral blood smears: case report and review of literature 1954-2013. Mycopathologia 2015. 180 (1-2): 111-16.
 17. Manzoni D., Sujobert P. Diagnosis of bacteremia on a blood smear. Blood. 2015. 125 (13): 2173.
 18. Rana C. Gram negative bacteremia diagnosed on peripheral blood smear examination. J. Hematol. 2015. 4 (1): 155–156.
 19. Kargaltseva N.M. Patent RU 2 098 486 C1 Russian Federation, MPK 6 C12Q 1/04. Method of diagnosis of bacteremia; applicant and copyright holder Kargaltseva N.M. № 2098486; Bjul., 1995. № 34.
 20. Kargaltseva N.M., Kocherovets V.I., Borisova O.Ju. et al. Patent RU 2 616 249 C1 Russian Federation; MPK GO1N 33/48. A method of rapid diagnosis of bloodstream infection; the applicant and the copyright holder of the GBUN MNIEM named after G.N. Gabrichevsky of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being. № 2616249; Bjul., 2017. № 11.

Образец ссылки на статью:

Каргальцева Н.М. Применение лейкоцитарного слоя пробы крови для диагностики инфекции кровотока. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2023. 2. 8 с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2023-2/Articles/NMK->

