

КИСЕЛЕВА

Екатерина Евгеньевна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИЕМИЙ И
СЕПСИСА У ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ТЕХНОЛОГИЙ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

14.01.21 – Гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор **Бессмельцев Станислав Семенович**

доктор медицинских наук, профессор **Чеботкевич Виталий Николаевич**

Официальные оппоненты:

Рукавицын Олег Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, начальник гематологического центра Федерального государственного казенного учреждения «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации; главный гематолог Министерства обороны Российской Федерации

Чухловин Алексей Борисович – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург)

Защита состоится «_____» _____ 2017 г. в _____ часов

на заседании диссертационного совета Д 208.074.01 при ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России (191024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института и на сайте ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России

Автореферат диссертации разослан «_____» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук

Татьяна Валентиновна Глазанова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Современное лечение гемобластозов основано на применении цитостатических препаратов, высокодозной химиотерапии и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Их использование позволило добиться значительных успехов в лечении онкогематологических больных, однако привело к возникновению ряда побочных эффектов, связанных, в частности, с развитием тяжелых инфекционных осложнений, существенно усугубляющих течение основного заболевания [С.С. Бессмельцев, К.М. Абдулкадыров, 2014, 2016]. Так, показано, что при проведении химиотерапии инфекционные осложнения регистрируются у 40-90% больных [В.А. Войцеховский и др., 2012]. Причем инфекционные осложнения у больных различными формами гемобластозов протекают особенно тяжело, часто с генерализацией процесса, развитием бактериемий и угрозой сепсиса. В связи с этим проблема предупреждения и лечения инфекционных осложнений приобретает особую актуальность.

Сепсис – важная проблема современной медицины, поскольку он является тяжелым осложнением многих заболеваний. Даже в развитых странах велика смертность от сепсиса. Так, в США, по разным оценкам, ежегодно регистрируется от 900 тысяч до 3 миллионов случаев бактериального или грибкового сепсиса, из которых летально заканчиваются 15-30% [D.E. Gaieski et al., 2013], в Германии сепсис является третьей по частоте причиной смерти [C. Engel et al., 2007]. Что касается смертности от сепсиса в России, то, например, в Смоленске по данным аутопсий за 2000-2004 гг. она составила 34,5 на 100 тысяч населения [Д.В. Галкин, 2005]. Следует отметить, что особую опасность сепсис представляет для иммуносупрессированных пациентов, в частности для больных различными формами гемобластозов [N. Mancini et al., 2008]. В последние годы определены основные тенденции изменения спектра возбудителей. Установлена широкая распространенность устойчивости к антибиотикам госпитальных штаммов микроорганизмов [Н.С. Багирова, 2015]. Это доказывает необходимость постоянного микробиологического мониторинга в стационарах, особенно в отделениях, где проводится лечение иммунокомпрометированных пациентов. Известно, что наряду с бактериями, важная роль в развитии инфекционных осложнений у онкогематологических больных отводится вирусам, в частности вирусам группы герпеса [В.Н. Чеботкевич, К.М. Абдулкадыров, 2002]. Однако роль их в развитии бактериемий и сепсиса недостаточно ясна.

Развитие бактериемий и сепсиса обусловлено тем, что бактерии попадают в кровь из очагов инфекции в легких, с кожи, мягких тканей, кишечника, мочевыводящих путей и других органов. Риск бактериемии существенно возрастает при проведении различных диагностических и лечебных процедур, в частности при использовании центрального венозного ка-

тетера. Установлено, что несвоевременное назначение адекватной противомикробной терапии значительно увеличивает риск летального исхода. Например, 48-часовая задержка лечения пациентов с эндокардитом увеличивает риск смерти в течение 14 дней в 5 раз [E.N. Vergis et al., 2001]. Поэтому необходимо своевременное этиотропное лечение, которое требует быстрой идентификации возбудителя и определения его чувствительности к антибиотикам. В то же время общеизвестные микробиологические методы не позволяют идентифицировать микроорганизмы в короткие сроки, поэтому существует насущная потребность в разработке более быстрых методов их выявления в крови.

Перспективным подходом к разработке методов выявления и идентификации патогенов в крови является использование технологий амплификации нуклеиновых кислот, которые также могут применяться для выявления маркеров антибиотикорезистентности. Главным преимуществом этих методов является скорость проведения исследования. Среди этих технологий наиболее широкое применение нашла полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Между тем, одной из основных трудностей при использовании ПЦР для выявления микроорганизмов в крови является малая концентрация возбудителей, а также наличие в ней ингибиторов, препятствующих прохождению реакции. Это диктует необходимость разработки пригодных для практики методов выявления и идентификации бактерий и грибов – возбудителей инфекций кровотока у больных с различными инфекционными осложнениями.

Степень разработанности темы исследования

Развитие инфекционных осложнений у иммуносупрессированных больных усугубляет течение основного заболевания и может стать причиной летального исхода. Поэтому в исследованиях последних лет большое внимание уделяется изучению особенностей спектра возбудителей бактериемий и сепсиса у пациентов, находящихся на лечении, а также определению уровня чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам [Н.В. Мальцева и др., 2014; А.А. Соколов, 2009]. Накоплено значительное количество данных об инфекционных осложнениях и у больных гемобластозами [Г.А. Клясова, 2007; О.В. Полухина, 2014, Т.В. Чуданова, 2003]. Тем не менее, структура возбудителей бактериемий и сепсиса и их чувствительность к антибиотикам в любом стационаре со временем изменяются, что свидетельствует о настоятельной необходимости постоянного мониторинга спектра возбудителей инфекций кровотока и их чувствительности к противомикробным препаратам. Известно, что большую роль в развитии инфекционных осложнений у онкогематологических больных играют не только бактерии и микромицеты, но и вирусы [В.Н. Чеботкевич, К.М. Абдулкадыров, 2002], при этом особое место среди них занимают вирусы группы герпеса, поскольку они способны формировать латентную инфекцию и при отсутствии своевременной диагностики и терапии могут приводить к тяжелым последствиям. Однако роль вирусов

группы герпеса при бактериемиях и сепсисе у онкогематологических больных изучена недостаточно и требует уточнения.

Несмотря на бурное развитие молекулярно-биологических методов и активное внедрение автоматизированных систем фенотипической идентификации бактерий, проблема быстрой и надежной индикации микробов в крови остается в центре внимания исследователей. Это связано с тем, что результаты исследований клинической применимости многих коммерчески доступных в настоящее время тест-систем для быстрой идентификации возбудителей инфекций кровотока часто являются противоречивыми [O. Opota et al., 2015]. Кроме того, большинство тест-систем производятся зарубежными фирмами и являются дорогостоящими. Целесообразной представляется разработка экономически более доступных отечественных методов быстрой этиологической диагностики инфекций кровотока.

Все вышесказанное свидетельствует о необходимости выполнения дополнительных исследований, что позволит в определенной мере восполнить существующие пробелы.

Цель исследования. Разработать и научно обосновать алгоритм ранней диагностики бактериемий и сепсиса с использованием технологий амплификации нуклеиновых кислот, позволяющий с высокой точностью идентифицировать возбудителей инфекций кровотока.

Задачи исследования

1. Провести анализ результатов бактериологического исследования крови онкогематологических больных за период 1991-2015 гг. для выявления динамики изменения спектра возбудителей бактериемии и сепсиса в этой группе пациентов.
2. Определить частоту выявления вирусов группы герпеса у онкогематологических больных с различными бактериальными и грибковыми осложнениями и их влияние на течение инфекционного процесса.
3. Разработать молекулярно-биологический метод ускоренного выявления и идентификации возбудителей бактериемий и сепсиса с использованием технологий амплификации нуклеиновых кислот у онкогематологических больных, оценить его чувствительность и специфичность.
4. Предложить этапы ранней диагностики бактериемий и сепсиса у онкогематологических больных с использованием разработанного молекулярно-биологического метода.

Научная новизна исследования

Проведен анализ бактерий и микромицетов, выявляемых в крови у онкогематологических больных за длительный период (1991-2015 гг.) и получены новые данные о видовом составе возбудителей и динамике их изменения.

Впервые на основании комплексной оценки результатов микробиологического исследования крови онкогематологических больных установлено повышение удельного веса грамотрицательных бактерий (в период 2002-2015 гг.) и микромицетов (в период 2011-2015 гг.).

Впервые установлено, что при бактериемиях у онкогематологических больных достоверно чаще в крови обнаруживаются геномы вирусов группы герпеса, в частности вируса Эпштейна-Барр и цитомегаловируса, что ухудшает течение инфекционного процесса.

Разработан метод на основе применения технологий амплификации нуклеиновых кислот, позволяющий сократить время выявления и идентификации микроорганизмов в гемокультуре с 48 часов и более до 5-7 часов, что необходимо для своевременного назначения адекватной антибактериальной терапии

Установлено, что по своей чувствительности и специфичности предложенный молекулярно-биологический метод идентификации бактериальных и грибковых возбудителей инфекций кровотока не уступает общепринятым микробиологическим методам.

Теоретическая и практическая значимость

Единый системный подход к бактериологическому обследованию существенно расширяет представление об этиологии инфекций кровотока у онкогематологических больных и создает теоретическую основу для дальнейших исследований в этой области.

Определен спектр бактериальных возбудителей инфекций кровотока у пациентов с опухолевыми заболеваниями системы крови.

На основании анализа многолетних наблюдений установлены важные для практики особенности изменения спектра возбудителей бактериемий и сепсиса у онкогематологических больных.

Обоснована важность и необходимость определения вирусов группы герпеса при возникновении бактериальных и грибковых осложнений у онкогематологических больных и установлено их негативное влияние на течение инфекционного процесса.

Установлено, что для этиологической диагностики сепсиса необходимо применение комплекса микробиологических и молекулярно-биологических методов.

Разработан и научно обоснован алгоритм этиологической диагностики бактериемий и сепсиса у онкогематологических больных, включающий выявление генетических маркеров антибиотикорезистентности бактерий, с использованием технологий амплификации нуклеиновых кислот, который существенно сокращает время исследования и позволяет своевременно назначать оптимальную этиотропную терапию.

Методология и методы исследования. Научная методология исследования основывается на системном подходе к изучаемой проблеме и комплексном рассмотрении процессов, лежащих в основе развития инфекционных осложнений у больных онкогематологическими

заболеваниями. В работе использованы микробиологические, молекулярно-биологические, клинические, статистические, а также общенаучные методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. На основании анализа результатов бактериологического исследования крови при инфекционных осложнениях у онкогематологических больных за период 1991-2015 гг. установлено периодическое изменение спектра выявляемых возбудителей: в 90-е годы XX в. отмечено достоверное увеличение частоты встречаемости грамположительных бактерий (до 90%), а в последние годы – грамотрицательных бактерий, а также микромицетов.
2. При бактериемиях у онкогематологических больных достоверно чаще ($p < 0,05$) выявляются геномы вирусов группы герпеса по сравнению с больными, у которых бактерии в крови выявлены не были, что существенно влияет на тяжесть течения инфекционного процесса.
3. Использование метода родовой и видовой идентификации микромицетов, бактерий и генетических маркеров их антибиотикорезистентности, основанного на применении ПЦР в режиме «реального времени», в совокупности с выявлением геномов вирусов в крови пациентов, позволяет в короткий срок установить этиологию инфекций кровотока, что крайне важно для начала целенаправленной этиотропной терапии.
4. Алгоритм диагностики бактериемий и сепсиса включает в себя 3 этапа:
 - выявление пациентов с подозрением на инфекции кровотока, с учетом клинической симптоматики;
 - забор крови и проведение гемокультивирования в автоматическом бактериологическом анализаторе;
 - идентификацию микроорганизмов и определение генов антибиотикорезистентности с использованием ПЦР в режиме «реального времени».

Внедрение результатов исследования в практику

Разработан, освоен и внедрен в практику работы лаборатории бактериологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России) метод выявления и идентификации возбудителей инфекций кровотока у онкогематологических больных с использованием технологий амплификации нуклеиновых кислот. Апробация разработанного метода производилась в лаборатории бактериологии, клиническом отделении гематологии, химиотерапии и трансплантации костного мозга с блоком интенсивной терапии ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России и в гематологическом отделении СПб ГБУЗ «Городская больница №15» города Санкт-Петербурга.

Итоги работы освещались на семинарских занятиях с клиническими ординаторами и аспирантами в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России. Материалы исследования используются в учебном процессе на циклах усовершенствования врачей в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Санкт-Петербург) и на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии и инфекционных болезней Института медицинского образования Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Степень достоверности результатов проведенного исследования подтверждается большим объемом наблюдений, адекватным набором оцениваемых показателей, спланированным дизайном работы, выбором для обработки материалов методов статистического анализа, соответствующего цели и задачам исследования и современному уровню науки.

Результаты, полученные в процессе выполнения работы, были представлены на российских научно-практических конференциях: Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии", посвященная 80-летию ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России (Санкт-Петербург, 2012 г.); научно-практическая конференция, посвященная 184-й годовщине образования Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета) (Санкт-Петербург, 2012 г.); научная конференция, посвященная 185-й годовщине образования Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета) (Санкт-Петербург, 2013 г.); III Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и службе крови" (Санкт-Петербург, 2014 г.); IV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и службе крови" (Санкт-Петербург, 2016 г.), IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика – 2017» (Москва, 2017 г.); и на международном конгрессе «XXVI Congrès de la Société Française transfusion sanguine» («XXVI Конгресс Французского Общества по переливанию крови», Париж, 2013 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 22 печатные работы, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, и 2 методических рекомендаций.

Личный вклад автора. Личное участие автора осуществлялось на всех этапах работы. Автором сформулирована цель и определены задачи исследования, предложены оптимальные пути их решения с использованием оригинальных методик. Диссертантом лично

выполнены бактериологические и молекулярно-биологические исследования, проведены анализ и обобщение полученных результатов. Проведена статистическая обработка данных.

Структура работы. Диссертационная работа изложена на 180 страницах текста и состоит из введения, главы обзора литературы, главы материалов и методов исследований, 2 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографии. Список литературы включает 234 источника, из которых 64 на русском языке. Работа содержит 38 рисунков и 29 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объект, материалы и методы исследования

Были проанализированы результаты бактериологического исследования 4923 образцов крови больных с различными онкогематологическими заболеваниями (острые и хронические лейкозы, множественная миелома, неходжкинские лимфомы, миелодиспластический синдром и др.) с постцитостатической нейтропенией и лихорадкой, находившихся на лечении в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России в период с 1991 по 2015 гг. Данные о пациентах были собраны в результате анализа историй болезни и записей в рабочих журналах, где фиксировались все положительные гемокультуры и другие микробиологические исследования.

Инфекционные осложнения диагностировали на основании клинических и лабораторных исследований. Синдром системной воспалительной реакции (ССВР) устанавливали при регистрации, по крайней мере, 2 из 4 клинико-лабораторных признаков: температура тела $>38^{\circ}\text{C}$ или $<36^{\circ}\text{C}$; частота сердечных сокращений $>90/\text{мин}$; частота дыхания $>20/\text{мин}$ или гипервентиляция ($\text{PaCO}_2 <32$ мм рт.ст.); лейкоциты крови $>12 \times 10^9/\text{л}$ или $<4 \times 10^9/\text{л}$, или незрелых форм $>10\%$. Диагностика сепсиса основывалась на клинических данных и подтверждалась выявлением культуры возбудителя в крови и других биосубстратах.

Для изучения роли вирусов группы герпеса в развитии бактериемий были выделены 2 группы пациентов с различными формами гемобластозов с постцитостатической нейтропенией и лихорадкой: первую группу составили 437 пациентов, у которых не было выявлено бактерий в крови, а во вторую группу вошел 21 пациент с подтвержденными бактериальными инфекциями кровотока. Для изучения частоты клинических проявлений и исходов бактериальных инфекций кровотока, а также выявления роли герпес-вирусов в их развитии, дополнительно были изучены истории болезни 64 пациентов с различными онкогематологическими заболеваниями с выявленными эпизодами обнаружения патогенов в крови. Характеристика обследованных больных представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика обследованных пациентов

Клинический диагноз	Число больных, <i>n</i>	Мужчины	Женщины	Средний возраст, лет
Множественная миелома	6	3	3	58,0 (44-79)
Острый лимфобластный лейкоз	8	3	5	34,0 (19-65)
Острый миелобластный лейкоз	27	11	16	52,4 (22-74)
Хронический лимфолейкоз	8	7	1	55,8 (46-72)
Хронический миелолейкоз	5	4	1	44,8 (42-66)
Неходжкинские лимфомы	8	7	1	44,9 (18-71)
Миелодиспластический синдром	2	1	1	61,5 (56-67)
<i>Всего</i>	<i>64</i>	<i>36</i>	<i>28</i>	

Забор крови для проведения бактериологического исследования выполнялся до начала противомикробного лечения. У большинства больных образцы крови забирали 2-3 и более раз за период нахождения на стационарном лечении. Отобранная кровь немедленно вносилась во флаконы с питательной средой для выявления бактерий и микромицетов. Всего было изучено 524 штамма микроорганизмов, полученных из гемокультур 390 больных. Кровь для исследования на вирусы группы герпеса отбирали путем пункции локтевых вен и внесения в пробирки типа «эппендорф», содержащие ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту).

Для проведения модельных опытов по проверке подобранных зондов, праймеров и наборов для идентификации бактерий, а также режимов амплификации при постановке ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) были использованы эталонные штаммы бактерий *Escherichia coli* ATCC 25922 (K-12) и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P (209P). Также в работе использовались штаммы бактерий, полученных от ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России», СПб ГБУЗ «Городская Мариинская больница» и от больных гематологического отделения ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России.

Для получения гемокультуры образцы крови засеивали в аэробные и анаэробные флаконы VacT/ALERT FN Plus (bioMérieux, США).

Для клинической проверки подобранных наборов для идентификации микроорганизмов методом ПЦР-РВ использовались гемокультуры, полученные при бактериологических исследованиях крови онкогематологических пациентов, находящихся на лечении в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, пациентов различных отделений СПб ГБУЗ «Городская Мариин-

ская больница», а также детей, госпитализированных в ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства».

Для выделения ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты) бактерий из цельной крови предварительный этап отмывки образца проводился с использованием реагента «Гемолитик» (ООО «ИЛС»). Выделение бактериальной ДНК проводили наборами для экстракции нуклеиновых кислот: «ДНК-сорб-АМ», «РИБО-преп», «ЦИТОЛИЗИН» (ООО «ИЛС»); «К-Сорб» (компания СИНТОЛ).

Идентификацию микроорганизмов разработанным методом, а также определение метициллин-резистентности *Staphylococcus spp.* и выявление генов приобретенных карбапенемаз у грамотрицательных бактерий проводили с использованием следующих наборов реагентов фирмы ООО «ИЛС»: «АмплиПрайм® ФлороЦеноз-Аэробы» (выявление бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.*), «ИМП-G+» (выявление *Enterococcus spp.*), «G-» (выявление *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*), «ИМП-скрин-FL» (выявление *Escherichia coli*), «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» (определение метициллин-резистентности *Staphylococcus spp.*), «АмплиСенс® MDR MBL-FL» и «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» (для выявления генов приобретенных карбапенемаз), «АмплиСенс® ФлороЦеноз/Кандиды-FL» (выявления *Candida spp.*).

Для выявления в крови геномов вирусов группы герпеса использовали наборы реагентов «АмплиСенс® HSV I,II-FL» (вируса простого герпеса 1, 2 типов (ВПГ-1,2)) и «АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ООО «ИЛС») (вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6)).

Для определения галактоманнана в сыворотке крови использовали метод одностадийного иммуноферментного анализа с помощью диагностической тест-системы «Platelia™ *Aspergillus Ag*» (Bio-Rad Laboratories, США). Диагностически значимым считался индекс >0,5.

Микробиологические анализы проводились по единой методике в течение всего периода исследования, в соответствии с действующей нормативной документацией. Определение чувствительности выделенных штаммов к антибиотикам осуществлялось диско-диффузионным методом [М.С. Поляк, 1997].

При клинической апробации используемых наборов и разработанного метода проводилось сравнение результатов идентификации бактерий в положительных гемокультурах при использовании ПЦР-РВ и бактериологического анализа. Для проверки дискордантных результатов в одной из серий исследований проводилось секвенирование выделенных микроорганизмов по методу Сэнгера (метод обрыва цепи).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы STATISTICA 6.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характеристика инфекций кровотока у онкогематологических больных

Проанализированы результаты бактериологического исследования 4923 образцов крови больных с различными онкогематологическими заболеваниями с постцитостатической нейтропенией и лихорадкой, находившихся на лечении в гематологическом отделении ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России в 1991-2015 гг. Частота положительных результатов бактериологического исследования составила 10,6% (524 случая). За исследуемый период была рассчитана частота выявления бактерий в зависимости от их грампринадлежности (рисунок 1).

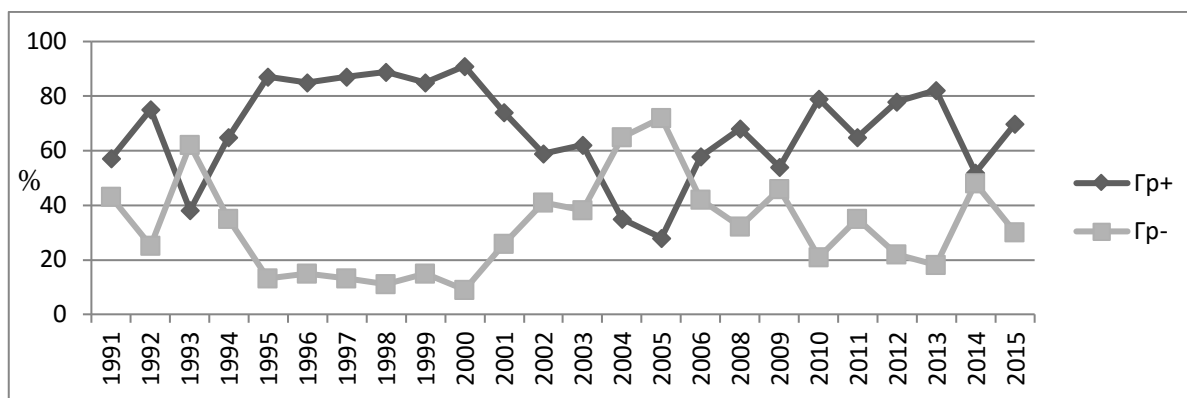


Рисунок 1 – Частота выявления грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов в разные годы наблюдения

В целом, за 25 лет выделено больше грамположительных бактерий, чем грамотрицательных (68% и 32% соответственно). С 1995 по 2000 год наблюдается резкое увеличение числа грамположительных микроорганизмов (85-91%). Это время соответствует периоду широкого внедрения центрального венозного катетера. Тем не менее, в последние годы выявлено достоверное увеличение частоты обнаружения грамотрицательных микроорганизмов: их количество возросло с 23,1% в 1991-2001 гг. до 39,6% в 2002-2015 гг. ($p < 0,05$). Такая активация грамотрицательных бактерий может быть связана с сокращением профилактики инфекционных осложнений с помощью фторхинолонов [М. Акова, 2006], а также с появлением полирезистентных штаммов. Одновременно с этим происходило и снижение частоты выявления грамположительных бактерий, что можно связать с улучшением контроля катетер-ассоциированных инфекций кровотока [Е.В. Сабирова и др., 2010].

Была проанализирована частота выявления микромицетов в крови обследованных больных с начала XXI века (2002-2015 гг.). Полученные данные представлены на рисунке 2.

Установлена тенденция к увеличению удельного веса микромицетов среди других инфекционных агентов. Так, в 2002, 2005, 2008-2009 гг. из крови высеивались исключительно бактерии, и вплоть до 2011 года частота выявления микромицетов не превышала 4,5%. В то же время их доля среди высеиваемых возбудителей в 2011, 2012, 2013 и 2015 годах составила, соответственно, 11,5%, 5,3%, 6,7% и 16,7%.

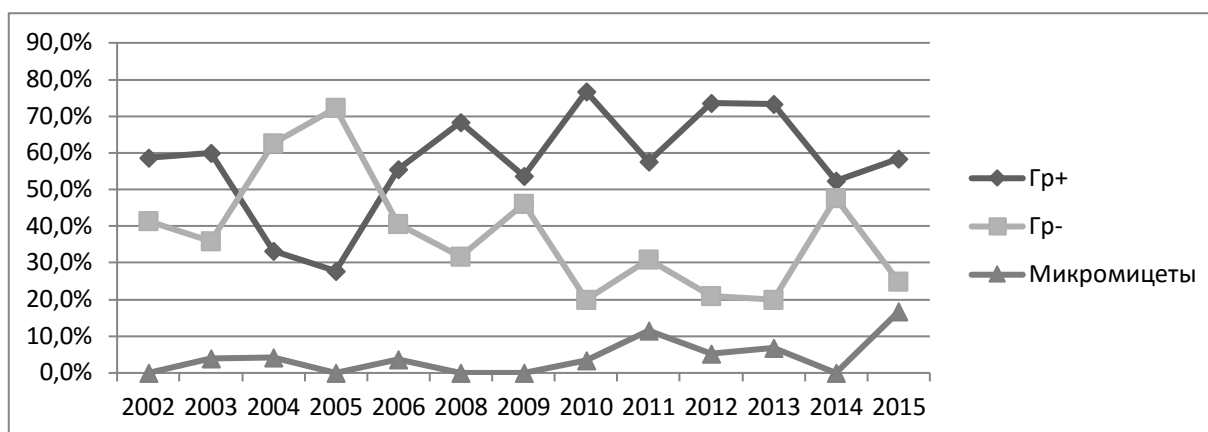


Рисунок 2 – Частота выявления микромицетов в крови больных за 2002-2015 гг. на фоне выявления грамположительных и грамотрицательных бактерий

Был проведен анализ видового состава микроорганизмов в крови онкогематологических больных за последние 8 лет (2008-2015 гг.) (рисунок 3). Полученные данные показывают, что грамположительные бактерии по-прежнему являются наиболее частыми патогенами, вызывающими бактериемии и сепсис у больных гемобластозами, однако значительно возросла частота выявления КНС (коагулазонегативных стафилококков) среди грамположительных бактерий (60% на 1991-2007 гг. и 80,6% на 2008-2015 гг.), в то время как частота выявления *S. aureus* снизилась более чем в 2 раза (15,8% до 2008 года и 7,4% после), а *Streptococcus spp.* вообще не выявлялись. В отношении состава грамотрицательных бактерий никаких значительных изменений выявлено не было, за исключением того, что за исследуемый 8-летний период не были обнаружены *Klebsiella spp.* и *Salmonella spp.*

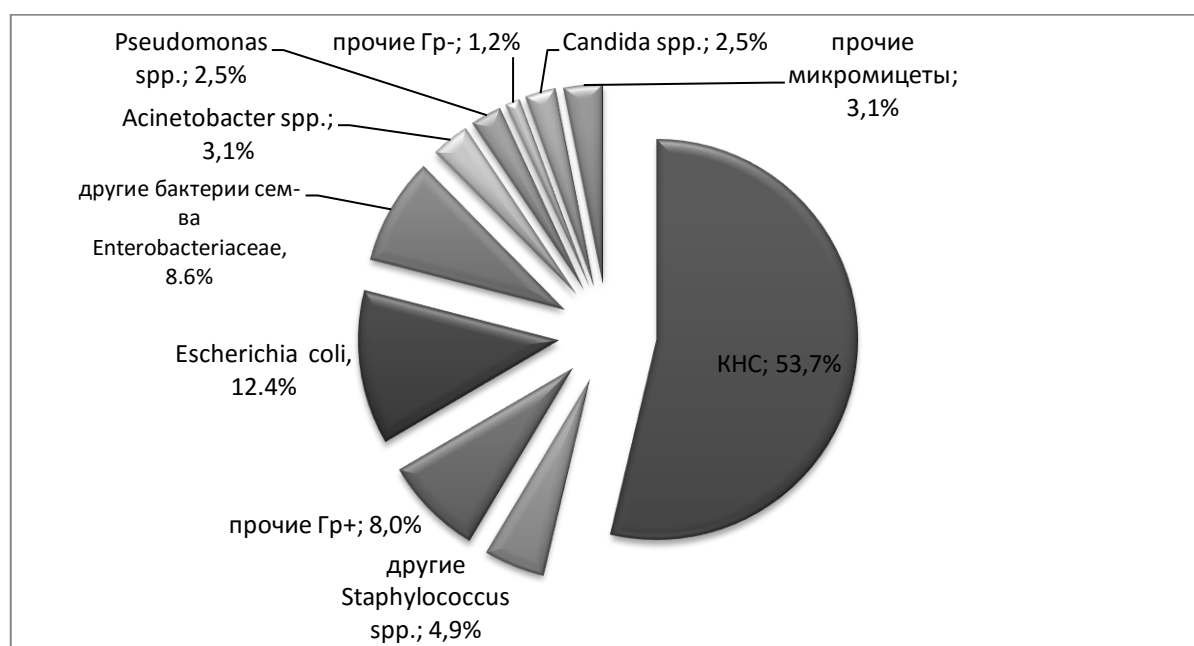


Рисунок 3 – Видовой состав микроорганизмов, встречающихся в крови онкогематологических больных в 2008-2015 гг.

Среди микромицетов чаще всего выявлялись дрожжеподобные грибы рода *Candida*. Несколько раз у одного и того же больного из порт-катетера выделялись черные дрожжи семейства *Dematiaceae* (*Exophiala spp.*), однако при высеве крови, взятой напрямую из вены, они не были обнаружены. Выявлены 2 случая смешанной бактериально-грибковой инфекции: в одном случае выделены *S.epidermidis* и дрожжевые грибы *Rhodotorula spp.*, у другого пациента вместе с *S.epidermidis* дважды за 10 дней выделялся *Aspergillus flavus*.

Для уточнения роли вирусов группы герпеса в развитии бактериемий и сепсиса у больных гемобластозами выделены 2 группы пациентов с опухолевыми заболеваниями системы крови с постцитостатической нейтропенией и лихорадкой: 1-я – пациенты, у которых бактерии в крови выявлены не были; 2-я – больные с подтвержденными бактериальными инфекциями кровотока. В обеих группах было проведено сравнительное исследование частоты выявления вирусов группы герпеса в крови (рисунок 4). На основании полученных данных было установлено, что частота выявления геномов ВЭБ и ЦМВ в крови больных 2-й группы (с бактериемией) достоверно выше ($p<0,05$) по сравнению с больными 1-й группы.

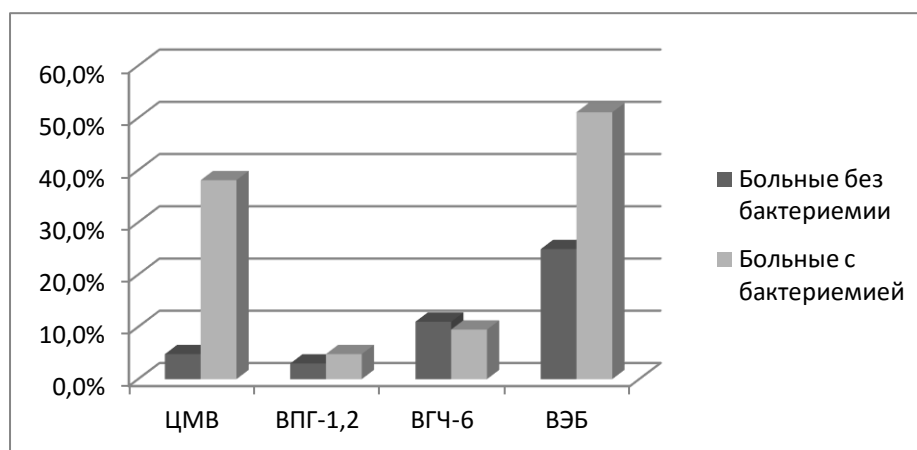


Рисунок 4 – Частота выявления геномов герпесвирусов у больных гемобластозами

Разработка молекулярно-биологических методов выявления бактерий в крови

В работе проведено изучение частоты клинических проявлений и исходов бактериальных инфекций кровотока, а также выявления роли герпесвирусов в их развитии, для чего были изучены истории болезни 64 пациентов с различными онкогематологическими заболеваниями с эпизодами обнаружения патогенов в крови. Всего было выявлено 33 случая подтвержденного сепсиса, в 11 (33,3%) из которых он протекал на фоне герпесвирусной инфекции. В 5 эпизодах наблюдался септический шок. Сепсис, вызванный грамположительными бактериями, зарегистрирован в 57,6% (19 случаев), а грамотрицательными – в 42,4% (14 случаев). Смертность при грамположительном сепсисе составила 10,5% (2 случая из 19), а при грамотрицательном – 57% (8 случаев из 14). Эти данные подтверждают, что грампринадлежность бактерий влияет на тяжесть течения инфекционного процесса и его исход.

Исходя из этого, нами был разработан метод быстрого выявления бактерий в цельной крови и определения их грампринадлежности с использованием ПЦР-РВ. Суть разработанного метода состоит в том, что после экстракции ДНК из цельной крови проводится ПЦР на выявление в гене 16S рРНК (рибосомной рибонуклеиновой кислоты) участка, общего для всех бактерий. При получении положительного результата, проводится ПЦР на определение грампринадлежности микроорганизмов. Такой метод позволяет в короткий срок (5-7 часов) выявить бактерии в кровотоке, а также дать информацию об их грампринадлежности.

Подобраны прямой (DG74 5'-GGAGGTGATCCAACCGCA-3') и обратный (RW01 5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3') праймеры и зонд (urp2-(5'FAM)AATACGTTCCCGGGCGTACACACCGCCCGTCACA (3'BHQ1)) для определения 16S рРНК.

При сопоставлении последовательности генов 16S рРНК нескольких десятков клинически значимых бактерий были выделены по крайней мере три точечные нуклеотидные замены, одинаковые для грамположительных и грамотрицательных бактерий. Были подобраны нуклеотидные последовательности прямых праймеров на грамположительные бактерии (gpos 5'-GATGACGTCAAATCATCATGC-3') и на грамотрицательные бактерии (gneg 5'-ATGACGTCAAGTCATCATGG-3') для определения грампринадлежности бактерий методом ПЦР. В качестве обратного праймера и флуоресцентного зонда в данном случае подходят те же DG74 и urp2, что и при универсальной ПЦР.

При проведении ПЦР для выявления бактерий в цельной крови необходимо освободить образец от преобладающей в пробе ДНК человека, поскольку ее наличие значительно снижает специфичность амплификации и приводит к получению ложноположительных результатов. Нами был предложен способ, позволяющий сконцентрировать бактерии в образце, одновременно избавившись от лейкоцитарной ДНК. Технология предложенного метода заключается в том, что образец обрабатывают гемолитическим раствором, а затем центрифугируют, в результате чего лейкоциты разрушаются, лейкоцитарная ДНК переходит в раствор, а бактерии остаются в осадке, при этом сохраняя жизнеспособность. Такой способ обработки крови перед процедурой выделения ДНК показал свою высокую эффективность.

Однако практическое применение разработанного метода несколько затруднено. Связано это с тем, что реакционная смесь для проведения ПЦР содержит небольшое количество бактериальной ДНК, поскольку один из компонентов смеси, фермент Taq-полимераза, получают из грамотрицательных бактерий. Это дает значительный фоновый сигнал при постановке реакции, что может приводить к получению ложноположительных результатов. Для их исключения необходимо осуществлять инактивацию фоновой ДНК. По результатам проведенных экспериментов удалось выяснить, что соединение 8-метоксипсорален при облучении ультрафиолетом, способно значительно снизить фоновый сигнал, однако при этом значи-

тельно снижается эффективность работы фермента, что при малой бактериальной нагрузке образца может привести к получению ложноотрицательного результата. Эти проблемы могут быть решены при использовании полимеразы, свободной от бактериальной ДНК, которая представлена на рынке, например, фирмой «Molzum» (Германия). Однако из-за высокой цены она доступна лишь для ограниченного круга лабораторий, а отечественные аналоги такого фермента отсутствуют.

На основании проведенных исследований был сделан вывод о том, что разработанный метод на основе ПЦР-РВ является высокочувствительным (10 КОЕ/мл), специфичным, быстрым (результат может быть получен за 5-7 часов) и может быть использован для ускоренного выявления бактерий в цельной крови пациентов и определения их принадлежности.

Метод родовой и видовой идентификации бактерий в гемокультуре с использованием ПЦР в режиме «реального времени»

Учитывая недостатки и технические трудности выявления бактерий в цельной крови, было принято решение разработать метод на основе ПЦР-РВ для выявления бактерий и их видовой идентификации в крови онкогематологических больных после гемокультивирования. Важным преимуществом предварительного гемокультивирования является выявление только жизнеспособных микроорганизмов, имеющих клиническое значение.

По результатам проведенного нами исследования был определен спектр возбудителей инфекций кровотока, и совместно с ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора были разработаны и подобраны наборы для выявления ДНК микроорганизмов, которые чаще всего выявляются в крови онкогематологических больных. В панель были включены наборы для выявления бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, идентификации *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*; а также бактерий рода *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Enterococcus*. Кроме того, в панель вошел набор, позволяющий выявлять 5 представителей грибов рода *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*. Дополнительно был включен набор для определения метициллин-резистентность стафилококков, а также два набора для выявления генов приобретенных карбапенемаз (групп КРС и ОХА-48-подобных (ОХА-48 и ОХА-162), а также карбапенемазы класса металло-β-лактамаз групп VIM, IMP, NDM).

Для определения специфичности метода были проведены исследования с искусственной бактериальной контаминацией крови различными видами микроорганизмов. Исследования показали, что метод имеет 100% специфичность: проверяемые микроорганизмы всегда определялись точно. Примеры кривых, полученных при проведении ПЦР-РВ, представлены на рисунке 5 а,б (результат считается положительным, если кривая образца пересекает пороговую линию ранее Калибратора 1).

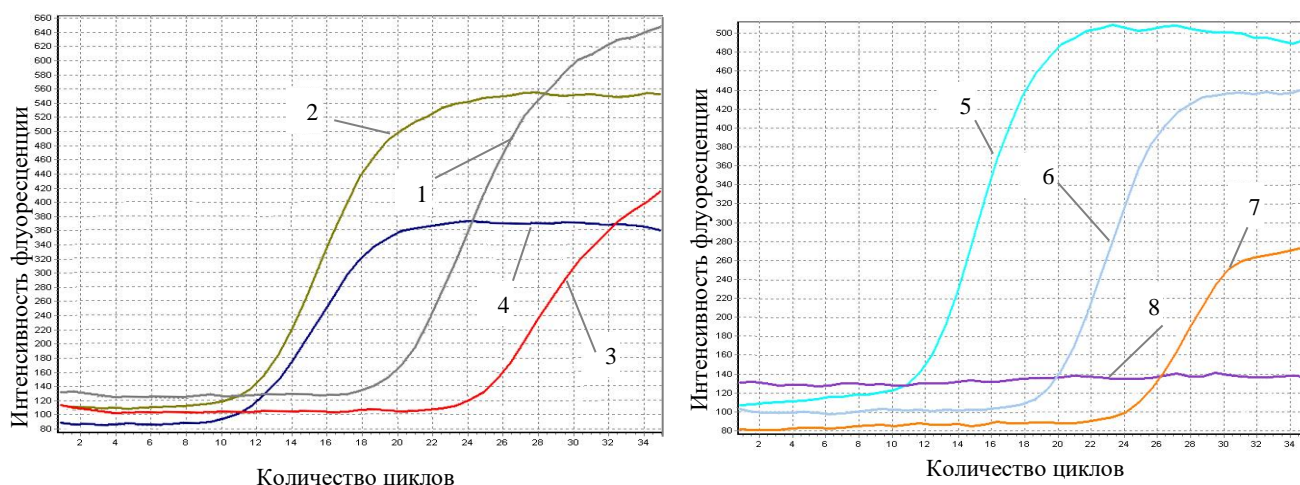


Рисунок 5 – Проверка специфичности разработанного метода

Кривые: 1, 6 – Калибратор 1; 2 – *S. epidermidis*; 3, 7 – Калибратор 2; 4 – *S. haemolyticus*; 5 – *K. pneumoniae*; 8 – *K. oxytosa* (результат отрицательный, т.к. набор разработан только на выявление *K. pneumoniae*, что подтверждает специфичность метода)

При разработке метода была оптимизирована процедура выделения ДНК микроорганизмов из гемокультуры. Это было необходимо, поскольку коммерчески доступные наборы для выделения ДНК не могут в полной мере очистить нуклеиновую кислоту от компонентов питательной среды и элементов крови, присутствующих в гемокультуре. В результате была разработана модификация методики выделения ДНК одного из существующих на рынке сорбентных методов.

Кроме того, режимы амплификации, используемые при постановке ПЦР с помощью выбранных наборов, изначально разрабатывались для проведения реакции на зарубежных амплификаторах. Поэтому предложенные режимы были оптимизированы для проведения ПЦР на отечественных приборах. Параллельное сравнение результатов амплификации на приборах Rotor-Gene 6000 (Австралия) и АНК-32 (Россия) показало, что величина пороговых циклов и вид кривых на обоих амплификаторах различаются незначительно, поэтому метод может с успехом применяться на отечественном оборудовании без снижения эффективности ПЦР. Это значительно удешевляет исследование и делает его более доступным.

Разработанный метод основан на постановке ПЦР-РВ после проведения гемокультивирования, что предполагает наличие большого числа бактерий в положительной гемокультуре. Поэтому в пробе, полученной после экстракции ДНК, может содержаться ее избыточное количество, в некоторых случаях ингибирующее ПЦР, что может приводить к получению ложноотрицательных результатов. Серия проведенных опытов показала, что вид кривых и эффективность ПЦР не изменяются, если уменьшить концентрацию ДНК в пробе в 10 раз. Исходя из этого, был сделан вывод, что при постановке ПЦР-РВ после гемокультивирования следует разбавлять экстрагированную из образца ДНК во избежание ингибирования ПЦР.

Таким образом, суть разработанного метода состоит в том, что после получения положительной гемокультуры из автоматического анализатора, производится выделение ДНК патогена, а затем проводится ПЦР-РВ с выбранными наборами. Проведение ПЦР позволяет сократить время идентификации возбудителя инфекций кровотока до 5-7 часов.

Аналитическая чувствительность разработанного метода является достаточно высокой – он позволяет определять наличие патогена в образце при его начальной концентрации 1-10 КОЕ/мл, что было подтверждено соответствующей серией опытов.

Оценку клинической чувствительности проводили в трех сериях экспериментов. Чувствительность метода определялась на основании сравнения результатов исследования гемокультур с помощью классического микробиологического метода и разработанного метода на основе ПЦР. На первом этапе было исследовано 47 гемокультур, полученных как от пациентов с различными опухолевыми заболеваниями системы крови, так и от пациентов, страдающих другими заболеваниями (таблица 2). Результаты совпали в 87,2% случаев. Однако с помощью секвенирования в нескольких случаях были подтверждены результаты, полученные при проведении ПЦР-РВ, и чувствительность разработанного метода возросла до 93,6%.

Таблица 2 – Оценка клинической чувствительности разработанного метода (1-й этап)

Микробиологический метод	ПЦР-РВ
4 образца с <i>K. pneumoniae</i>	4 образца <i>K. pneumoniae</i>
5 образцов с <i>E. coli</i> , в одном случае в сочетании с <i>E. faecium</i> .	в 4 образцах <i>E. coli</i> , в пятом — ДНК бактерий сем. <i>Enterobacteriaceae</i> (не <i>E. coli</i>). + была обнаружена ДНК других микроорганизмов: в двух случаях — <i>Enterococcus spp.</i> , в третьем — <i>MSSA</i>
5 образцов с <i>Candida albicans</i> , в 1 случае в сочетании с <i>Staphylococcus hominis</i> .	5 образцов с <i>Candida albicans</i> , в одном случае в сочетании с <i>MRSA</i> .
5 образцов с <i>Enterococcus spp.</i> : 1 — <i>E. faecium</i> , 1 — <i>E. gallinarum</i> , 2 — <i>E. faecalis</i> , 1 — смесь <i>E. faecalis</i> и <i>S. aureus</i> .	5 образцов с <i>Enterococcus spp.</i> , в одном в сочетании с ДНК <i>MRSA</i> .
26 образцов с <i>Staphylococcus spp.</i> : 14 — <i>S. epidermidis</i> , из них 10 являются метициллин-резистентными; 5 — <i>S. haemolyticus</i> ; 4 — <i>S. hominis</i> , 2 — <i>MRSA</i> и в 1 образце — <i>S. auricularis</i> .	26 образцов <i>Staphylococcus spp.</i> : в 1 — <i>MSSA</i> , в 24 — <i>MRCoNS</i> , в 1 — <i>MSCoNS</i> . Было получено 2 дискордантных результата, но секвенирование подтвердило результаты ПЦР-РВ.
В 2 образцах, взятых в разное время от одного пациента, выявлены неферментирующие грамотрицательные бактерии	Отрицательный результат для использованных наборов. Секвенирование - <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .
Примечание: <i>MSSA</i> – метициллин-чувствительный <i>S. aureus</i> ; <i>MRSA</i> – метициллин-резистентный <i>S. aureus</i> ; <i>MRCoNS</i> – метициллин-резистентный КНС	

На втором этапе было исследовано еще 20 гемокультур, полученных только от онкогематологических больных. Совпадение результатов бактериологического метода и ПЦР-РВ составило 90% (18 из 20 случаев). Из 2-х дискордантных результатов в 1 случае было выяв-

лено совпадение до уровня рода (*Staphylococcus spp.*), а на видовом уровне результаты отличались: микробиологическим методом в гемокультуре был определен *MRCoNS*, а методом ПЦР – *MSSA*. Данный дискордантный результат может являться следствием изменения биохимических свойств штамма стафилококка под действием химиотерапии.

Третья серия исследований проводилась на 23 гемокультурах, полученных от детей с тяжелыми инфекционными заболеваниями, протекающими с синдромом полиорганной недостаточности, госпитализированных в ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства». Результаты совпали в 82,6% случаев. Относительно низкая чувствительность метода при проверке на культурах от детей была следствием того, что в четырех случаях бактериологическим методом были выявлены микроорганизмы (*Candida lusitanae*, *Trucella otitidis*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis*), которые не входили в разработанный набор для диагностики инфекций кровотока у взрослых онкогематологических пациентов, поскольку они не были обнаружены у них ни в одном случае. Чтобы повысить результативность метода в отношении этой группы пациентов необходимо расширить панель определяемых микроорганизмов в соответствии со спектром выявляемых в стационаре патогенов.

Таким образом, была подтверждена эффективность разработанного метода выявления и идентификации бактерий с использованием ПЦР в режиме «реального времени». В целом, чувствительность метода при анализе 90 гемокультур, полученных от пациентов с различными заболеваниями составила 90%. Разработанный метод в комплексе с мониторингом вирусных инфекций, также осуществляемым с использованием ПЦР-РВ, позволяет в короткий срок установить этиологию инфекционных осложнений, что крайне важно для своевременного начала целенаправленной этиотропной терапии.

Алгоритм выявления и видовой идентификации бактерий в крови с использованием ПЦР в режиме «реального времени»

По результатам проведенных исследований был разработан алгоритм диагностики бактериемий и сепсиса с использованием разработанного молекулярно-биологического метода (рисунок 6). Предлагаемый алгоритм состоит из 3 этапов:

1 этап: выявление пациентов с подозрением на инфекции кровотока, с учетом клинической симптоматики.

2 этап: при подозрении на инфекции кровотока у пациента производится посев крови с дальнейшей инкубацией в автоматическом анализаторе.

3 этап: при наличии роста производится идентификация микроорганизма с помощью ПЦР в режиме «реального времени». Дополнительно проводится определение метициллин-резистентности или проверяется наличие генов приобретенных карбапенемаз.

Важно отметить, что разработанный алгоритм выявления и идентификации возбудителей бактериемий и сепсиса является универсальным. Он подходит для разных групп пациентов, поскольку путем введения или исключения определенных микроорганизмов, панель выявляемых патогенов может быть оптимизирована для конкретного стационара. Внедрение в практику разработанного алгоритма позволит существенно сократить время проведения анализа, которое лимитируется только стадией роста микроорганизмов в автоматическом анализаторе, а процесс видовой и родовой идентификации патогенов с использованием ПЦР-РВ занимает не более 5-7 часов, в то время как для идентификации патогена в положительном флаконе классическими микробиологическими методами требуется не менее 48 часов.

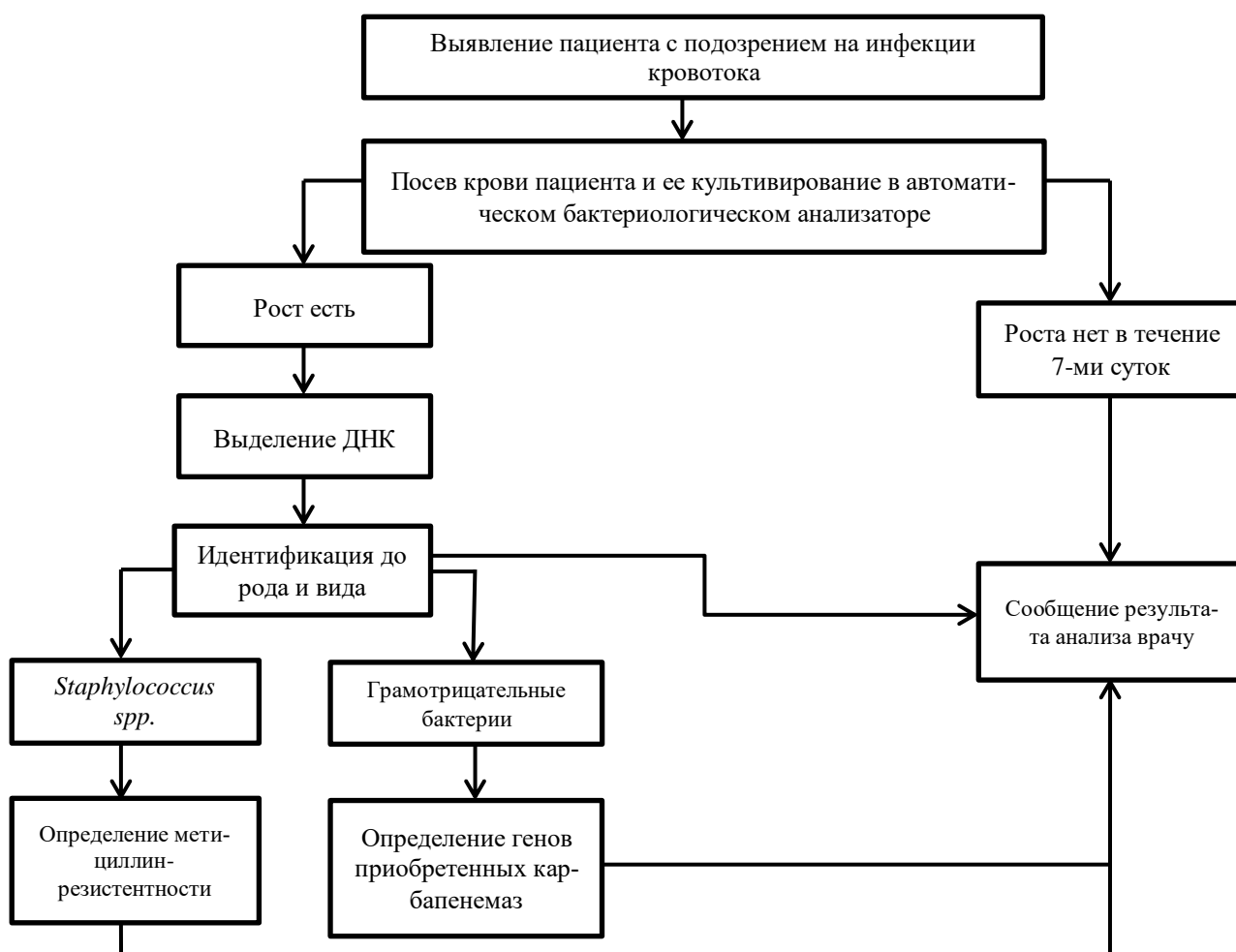


Рисунок 38 – Алгоритм выявления и видовой идентификации бактерий

ВЫВОДЫ

1. Выявлено достоверное увеличение частоты обнаружения грамотрицательных микроорганизмов в крови онкогематологических больных (с 23,1% в 1991-2001 гг. до 39,6% в 2002-2015 гг. ($p < 0,05$)), однако преобладающими остаются грамположительные микробы, среди которых чаще всего выявляются коагулазонегативные стафилококки; в пери-

од 2011-2015 гг. выявлен рост удельного веса микромицетов среди других инфекционных агентов, достигавшего в отдельные годы 11-16%.

2. В крови больных гемобластозами при бактериемиях достоверно чаще, чем у больных без бактериемии, обнаруживаются геномы вируса Эпштейна-Барр (в 2,1 раза) и цитомегаловируса (в 7,9 раза), что ухудшает течение инфекционного процесса и общее состояние больных.
3. Определен спектр наиболее часто встречающихся и значимых возбудителей бактериемий, фунгемий и сепсиса у онкогематологических больных.
4. Разработан метод раннего выявления и идентификации значимых возбудителей бактериемий и сепсиса и генетических маркеров их антибиотикорезистентности, который в комплексе с мониторингом вирусных инфекций позволяет в более ранние сроки (5-7 часов), по сравнению с общепринятыми микробиологическими исследованиями, устанавливать этиологию инфекционных осложнений, что дает возможность назначать или корректировать целенаправленную противомикробную терапию.
5. Предложен алгоритм диагностики бактериемий и сепсиса у онкогематологических больных с использованием технологий амплификации нуклеиновых кислот, позволяющий существенно сократить время выявления возбудителей инфекций кровотока, который может быть включен в протокол обследования больных с инфекционными осложнениями.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При обследовании пациентов с подозрением на инфекции кровотока целесообразно применять ускоренный метод диагностики, основанный на использовании технологий амплификации нуклеиновых кислот.
2. Для своевременной корректировки панели идентифицируемых микроорганизмов рекомендуется проводить постоянный мониторинг патогенов (а также генов резистентности бактерий к антибиотикам), выявляемых в крови больных при бактериемиях и сепсисе.
3. Целесообразно, наряду с контролем герпес-вирусных инфекций, включение алгоритма диагностики бактериемий и сепсиса с использованием технологий амплификации нуклеиновых кислот в протокол обследования больных с инфекционными осложнениями, с целью раннего выявления возбудителей инфекций и своевременного назначения этиотропной терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Щетинкина (Киселева), Е.Е. Бактериальная контаминация тромбоцитной взвеси и методы ее выявления / Е.Е. Щетинкина (Киселева), В.В. Бурылев, Н.П. Стижак // Трансфузиология. – 2012. – Т. 13, № 3. – С. 112-113.
2. Щетинкина (Киселева), Е.Е. Сравнительное исследование микробиологических и молекулярно-биологических методов выявления бактериальной контаминации гемокомпонентов / Е.Е. Щетинкина (Киселева) // Научно-практическая конференция, посвященная 184-й годовщине образования Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета), 29-30 ноября 2012 года.: Тез. докл. – СПб.: Изд-во СПбГТИ (ТУ), 2012. – С. 126.
3. **Чеботкевич, В.Н. Современные методы лабораторной диагностики сепсиса / В.Н. Чеботкевич, Е.И. Кайтанджан, В.В., Бурылев, Е.Е. Щетинкина (Киселева) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2013. – Т.15. - №4. – С. 295-300.**
4. Chebotkevich, V. Sécurité transfusionnelle en Russie / V. Chebotkevich, C. Schetinkina (Kiseleva), N. Stizhak // Transfusion Clinique et Biologique. – V. 20, Issue 3. – P. 305.
5. Чеботкевич, В.Н. Значение маркеров герпесвирусов у онкогематологических больных и доноров крови / В.Н. Чеботкевич, В.В. Бурылев, Е.И. Кайтанджан, Е.Е. Щетинкина (Киселева) // V Ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням, 25-27 марта 2013 года.: Тез. докл. – М, 2013. – С. 441
6. Щетинкина (Киселева), Е.Е. Разработка молекулярно-биологического метода выявления бактерий в крови / Е.Е. Щетинкина (Киселева), В.В. Бурылев // Научная конференция, посвященная 185-й годовщине образования Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета), 27 ноября 2013 года.: Тез. докл. – СПб.: Изд-во СПбГТИ (ТУ), 2013. – С. 386-387.
7. Стижак, Н.П. Методы обеспечения инфекционной безопасности крови / Н.П. Стижак, В.В. Бурылев, Е.Е. Щетинкина (Киселева), Н.П. Сивакова, С.С. Бессмельцев, И.С. Голованова, А.В. Чечеткин, В.Н. Чеботкевич // Трансфузиология. – 2014. – Т. 15, № 1. – С. 61-62.
8. Стижак, Н.П. Этиология бактериемий и фунгемий у онкогематологических больных / Н.П. Стижак, Е.И. Кайтанджан, Е.Е. Щетинкина (Киселева), В.Н. Чеботкевич // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16, № 2. – С. 133-134.
9. **Щетинкина (Киселева), Е.Е. Этиология бактериемий и сепсиса у больных гемобластозами / Е.Е. Щетинкина (Киселева), В.В. Бурылев, Е.И. Кайтанджан, Н.П.**

Стижак, С.С. Бессмельцев, В.Н. Чеботкевич // БИОМЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ Medline.ru. – 2014. – Т. 15, статья 41. – С. 511-518.

10. Матосова, С.В. Апробация методики на основе ПЦР в режиме реального времени для расшифровки этиологии септических состояний / С.В. Матосова, Ю.А. Савочкина, С.Н. Гаврилов, О.Ю. Шипулина, В.В. Бурылев, С.С. Бессмельцев, В.Н. Чеботкевич, Е.Е. Щетинкина (Киселева), М.В. Смирнова // Вестник гематологии. – 2014. – Т. X, № 4. – С. 39-40.
11. Чеботкевич, В.Н. Актуальные вопросы обеспечения инфекционной безопасности гемотрансфузий у иммунодепрессивных онкогематологических больных / В.Н. Чеботкевич, С.Д. Волкова, Г.Ю. Кирьянова, Е.И. Кайтанджан, Е.Е. Щетинкина (Киселева) // Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 55-летию института. – Киров, 2015. – С. 141-144.
12. Чеботкевич, В.Н. Инфекционные осложнения у больных гемобластомами и депрессиями кроветворения / В.Н. Чеботкевич, С.С. Бессмельцев, Е.Е. Киселева, Е.И. Кайтанджан, Н.П. Стижак, В.В. Бурылев // Сборник тезисов Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Полиморбидность патологии – важнейшая проблема современного скоромощного стационара», посвященная 55-летию СПб ГБУЗ «Городская больница № 15», 10-11 сентября 2015 г. – СПб, 2015. – С. 52-53.
13. **Чеботкевич, В.Н. Проблемы бактериальной безопасности гемотрансфузий / В.Н. Чеботкевич, Е.И. Кайтанджан, Е.Е. Киселева, В.В. Бурылев, А.В. Чечеткин // Трансфузиология. – 2015. – Т. 16, № 3. – С. 14-25.**
14. Чеботкевич, В.Н. Вирусные и бактериальные инфекции кровеносного русла у иммуносупрессивных онкогематологических больных / В.Н. Чеботкевич, Е.И. Кайтанджан, Е.Е. Киселева, В.В. Бурылев, Н.П. Стижак // Вестник гематологии. – 2016 – Т. XII, № 2. – С. 65-66.
15. Chebotkevich, V. Epidemiology and clinical characteristics of bloodstream infections in hematological cancer patients / V. Chebotkevich, E. Kiseleva, N. Stizhak, E. Kaytandzhan, V. Burylev, A. Garifullin, S. Bessmeltsev // НАЕМАТОЛОГИКА. – 2016. – V. 101 (s1). – P. 765
16. Киселева, Е.Е. Роль бактериологической лаборатории в обеспечении инфекционной безопасности гемотрансфузий в учреждениях службы крови в России / Е.Е. Киселева, В.В. Бурылев, В.Н. Чеботкевич, А.В. Чечеткин // Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т. 6, № 3. – С. 259.
17. **Чеботкевич, В.Н. Клинико-микробиологическая характеристика инфекций кровотока у онкогематологических больных / В.Н. Чеботкевич, С.С. Бессмельцев, Е.Е.**

Киселева, Н.П. Стижак, Е.И. Кайтанджан, В.В. Бурылев // Онкогематология. – 2016. – Т. 11, № 3. – С. 58-67.

18. Киселева, Е.Е. Алгоритм выявления и видовой идентификации бактерий в крови с использованием молекулярно-биологического метода / Е.Е. Киселева // Вестник гематологии. 2016. – Т. XII, № 4. – С. 45-46.
19. Киселева, Е.Е. Клинико-микробиологическая характеристика инфекций кровотока у онкогематологических больных / Е.Е. Киселева, В.Н. Чеботкевич, С.С. Бессмельцев, Н.П. Стижак, Е.И. Кайтанджан, В.В. Бурылев // Вестник гематологии. – 2016. – Т. XII, №4. – С. 46-47.
20. Бурылев, В.В. Использование биочипов при скрининге донорской крови / В.В. Бурылев, Е.Е. Киселева, В.Н. Чеботкевич // Вестник гематологии. – 2016. – Т. XII, №4. – С. 67.
21. Киселева, Е.Е. Алгоритм выявления и видовой идентификации бактерий в крови с использованием ПЦР / Е.Е. Киселева // Вестник гематологии. – 2017. – Т. XIII, №1. – С. 19-24.
22. Chebotkevich, V.N. Bloodstream infections and herpesvirus activation following intensive chemotherapy of adult oncohematological patients / V.N. Chebotkevich, S.S. Bessmeltsev, E.E. Kiseleva, N.P. Stizhak, E.I. Kaytandzhan, V.V. Burylev // Cellular Therapy and Transplantation. – 2016. – V. 5, № 4(17). – P. 21-31.

Список сокращений:

ВГЧ-6	- вирус герпеса человека 6-го типа
ВПГ-1,2	- вирус простого герпеса человека 1,2 типов
ВЭБ	- вирус Эпштейна-Барр
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
КНС	- коагулазонегативные стафилококки
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	- полимеразная цепная реакция в режиме «реального времени»
рРНК	- рибосомная рибонуклеиновая кислота
ССВР	- синдром системной воспалительной реакции
ЦМВ	- цитомегаловирус
ЭДТА	- этилендиаминтетрауксусная кислота
<i>MRCoNS</i>	- метициллин-резистентные коагулазонегативные стафилококки
<i>MRSA</i>	- метициллин-резистентные <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>MSSA</i>	- метициллин-чувствительные <i>Staphylococcus aureus</i>